

GLAUCIA LUNKMOSS

**EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS AJUSTADAS COM
ÓXIDO DE TRIMETILAMINA (TMAO), SACAROSE, BETAÍNA OU
CLÓRETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO
EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RÃ**

Dissertação apresentada à Coordenação
do Curso de Pós-graduação em Biologia
Celular, da Universidade Federal do
Paraná, sob orientação do Professor
Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller
Fogaça, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Biologia
Celular.

CURITIBA

2002

GLAUCIA LUNKMOSS

**EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS AJUSTADAS COM
ÓXIDO DE TRIMETILAMINA (TMAO), SACAROSE, BETAÍNA OU
CLÓRETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO
EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RÃ**

Dissertação apresentada à Coordenação
do Curso de Pós-graduação em Biologia
Celular, da Universidade Federal do
Paraná, sob orientação do Professor
Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller
Fogaça, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Biologia
Celular.

CURITIBA

2002

À minha mãe Marilena, ao
meu falecido pai Harry e à
minha filha Verônica

AGRADECIMENTOS

À Deus que com certeza me acompanhou, me fortalecendo e guiando por esta difícil mas gratificante jornada.

À minha família. Meu pai Harry que no meio desta caminhada me deixou, mas não me abandonou. Minha mãe Marilena, que me apoiou em todos os momentos. Minha irmã Josiette, que sempre me incentivou.

À minha filha Verônica, que compreendeu as minhas ausências durante estes dois anos e meio.

Ao meu professor e orientador Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça. Como professor me ensinou os caminhos da pesquisa e da ciência, e como orientador me orientou para os caminhos certos da vida.

Aos meus amigos que me ajudaram a levantar a cabeça, bater a poeira e dar a volta por cima em todas as dificuldades apresentadas à mim.

Aos meus colegas de laboratório, que muito me ajudaram na realização da parte prática e na discussão deste trabalho. Em especial ao colega Edson Oliveira, que com sua paciência, me fez pensar e raciocinar sobre as questões referentes ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério pelos cuidados que dedicaram aos animais utilizados nas minhas pesquisas.

Ao professor Sílvio Sanches que muito me ajudou quando meu pai estava doente. Sempre presente colocou seu laboratório a disposição quando precisei. Como também a sua orientanda Márcia, que me ajudou a realizar um passo importante na pesquisa deste trabalho.

À professora Carolina A. de O. Freire pela importante colaboração e mensuração da osmolaridade das soluções utilizadas neste trabalho.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

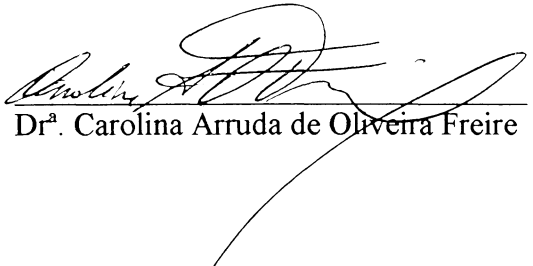
A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “EFEITOS DE SOLUÇÕES HIPERTÔNICAS AJUSTADAS COM ÓXIDO DE TRIMETILAMINA (TMAO), SACAROSE, BETAÍNA OU CLORETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RÃ”, de autoria da pós-graduanda **Glaucia Lunkmoss**, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça (Orientador e Presidente do Departamento de Fisiologia da UFPR), Dr. Kleber Gaspar da Silva (UDESC) e Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, nota: 9,0 (NOVE); Dr. Kleber Gaspar da Silva, nota: 9,00 (NOVE) e Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire, nota: 9,0 (NOVE). De acordo com as exigências do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: APROVADA com a nota: 9,0 (NOVE), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 18 de novembro de 2002.



Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça



Dr. Kleber Gaspar da Silva



Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire

ÍNDICE

Folhas de apresentação	I-III
Agradecimentos	IV
Índice	V
Lista de abreviaturas	VI
Lista de figuras	VII
Lista de tabelas	X
Resumo	XI
Summary	XII
1. INTRODUÇÃO	I
1.1 Osmose	1
1.2 Transporte através de membranas	3
1.3 Principais osmólitos naturais	5
1.4 Estrutura do músculo esquelético	14
1.5 Funcionamento do músculo esquelético	16
1.6 Atuação do íon cálcio na contração muscular	20
1.7 Teorias para explicar o comportamento do músculo esquelético quando em contato com soluções hipertônicas	24
1.8 Objetivos	30
1.8.1 Geral	30
1.8.2 Específicos	30
2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1 Músculo intacto	31
2.2 Protocolo experimental	32
2.3 Preparação da fibra muscular esquelética desmembranada com o uso de saponina	35
2.4 Mensuração do conteúdo hídrico do músculo sartório	36
3. RESULTADOS	40
3.1 Alterações da massa muscular induzida por TMAO, sacarose ou uréia	40
3.2 Efeitos das várias concentrações de TMAO, betaina, sacarose ou NaCl no músculo esquelético	40
3.3 Efeitos do TMAO conjuntamente com o perclorato	44
3.4 Efeitos da hipertonicidade na contratura cafeínica	48
3.5 Efeitos da interação da cafeína com o TMAO na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático de fibra isolada e permeabilizada com saponina	53
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC: Acoplamento excitação-contração
ATP: Adenosina trifosfato
BES: Ácido N,N-Bis (2 hidroxietil-2-aminoetanosulfônico)
DHP: Receptor dihidropiridínico
EGTA: Ácido etileno bis (b-amino etil eter N, N, N',N' tetracético)
kD: Kilodaltons
Km: Constante de Michaelis
mM: Milimolar
M: Molar
μm: Micrômetro
nm: nanômetro
pH= -log [H⁺]
Pi: Fósforo inorgânico
PFK: Enzima fosfofrutuquinase
RS: Retículo sarcoplasmático
RYR: Receptor de raionidina
Solução C: solução de carregamento
Solução L: solução para lavar a fibra para retirada da cafeína
Solução R: solução de relaxamento
Tf: Temperatura de fusão
TMAO: Óxido de trimetilamina
TRIS: Tris-(hidroxymethyl)-aminomethane

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dois compartimentos separados por uma membrana semipermeável	2
Figura 2	Sequência de íons da série de Hofmeister	6
Figura 3	Estrutura dos receptores DHP e RYR	19
Figura 4	Curso temporal das variações da massa do músculo sartório de rã submetidos à soluções contendo 300 mM de TMAO, sacarose ou uréia	42
Figura 5 A	Registro original de um experimento típico mostrando a potencialização da contratatura potássica, quando o músculo foi incubado previamente com TMAO	43
Figura 5 B	Efeitos de soluções com diferentes tonicidades ajustadas com TMAO, sacarose, betaina ou NaCl no encurtamento de músculo sartório de rã induzido por 100 mM de potássio	43
Figura 6 A	Registro original de um experimento típico mostrando os efeitos da exposição do músculo sartório de rã, à solução de Ringer contendo NaCl (150 mM) ou TMAO (300 mM) na contratatura induzida por 40 mM e 100 mM de potássio	45
Figura 6 B	Representação gráfica dos dados de encurtamento de músculo sartório de rã induzido por solução de Ringer contendo 40 ou 100 mM de potássio na ausência e na presença de 300 mM de TMAO ou de 150 mM de NaCl	45
Figura 7	Representação gráfica dos dados de encurtamento de músculo sartório de rã induzido pelo íon perclorato em solução de Ringer contendo 40 mM de potássio na ausência e na presença de TMAO (300 mM)	46

Figura 8	Registro original de um experimento típico demonstrando o efeito do íons perclorato na ausência (A) e na presença (B) de 50 mM de TMAO no encurtamento de músculo sartório da rã.	47
Figura 9 A	Registro original de um experimento típico demonstrando os efeitos do TMAO (50 mM) na presença de cafeína (2 mM) no encurtamento do músculo sartório da rã.	49
Figura 9 B	Representação gráfica dos dados de encurtamento muscular de preparações de músculo sartório isolado e intacto de rã: Efeitos da cafeína (2 mM) na ausência e na presença de TMAO (50 mM).	49
Figura 10 A	Registro original das variações de encurtamento muscular no tempo, em um experimento típico obtido de uma preparação exposta ao TMAO (50 mM), na ausência e na presença de cafeína (2 mM)	50
Figura 10 B	Efeitos da interação do TMAO (50 mM) e da cafeína (2 mM) no encurtamento de músculo sartório isolado de rã.	50
Figura 11 A	Registro original das variações de comprimento muscular obtido em um experimento típico: Efeitos da cafeína na ausência e na presença de sacarose (100 mM).	51
Figura 11 B	Representação gráfica dos resultados de encurtamento muscular de músculo sartório de rã: Efeitos da cafeína (2 mM) na ausência e na presença de sacarose (100 mM)	51
Figura 12	Representação gráfica dos dados de encurtamento muscular obtidos em experimentos de músculo sartório isolado de rã, submetidos às soluções hipertônicas ajustadas com NaCl (50 mM) na ausência e na presença de cafeína (2 mM)	52

Figura 13 Registro original de um experimento de fibra 54
muscular isolada de rã demonstrando os efeitos da cafeína (4
mM) isoladamente e em combinação com a sacarose (100 mM)
ou TMAO (100 mM) na produção de força.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das soluções empregadas em experimentos de músculo isolado de rã	33
Tabela 2	Composição das soluções utilizadas nas preparações de fibras musculares esqueléticas desmembranadas com o uso de saponina	37
Tabela 3	Composição da solução R. (relaxante) utilizada nas preparações de fibras musculares esqueléticas desmembranadas com o uso de saponina.	38
Tabela 4	Variações da massa de músculo sartório de rã na presença de TMAO, sacarose ou uréia	41

RESUMO

Empregando-se músculo sartório isolado de rã, avaliamos os efeitos de soluções hipertônicas (50 a 300 mM, ajustadas com sacarose, NaCl, betaína ou óxido de trimetilamina (TMAO)) nas contraturas cafeínicas ou por soluções de contendo 40 e 100 mM de de K. Em células isoladas deste músculo avaliamos os efeitos da interação da cafeína com a sacarose ou TMAO na liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. A contratura potássica foi inibida por soluções hipertônicas ajustadas com NaCl e betaína e potencializada com o uso da sacarose e TMAO. As soluções hipertônicas ajustadas com o uso destes osmólitos potencializaram as contrações induzidas pela cafeína (NaCl<sacarose<TMAO). Em fibras isoladas e permeabilizadas com saponina o aumento da tonicidade com sacarose ou TMAO não induziram a liberação de íons cálcio nem potencializaram os efeitos da cafeína. Estes resultados sugerem a o aumento da tonicidade e da força iônica do meio intracelular não é o único ou exclusivo mecanismo responsável pelas modificações do processo de acoplamento-excitação contração ou da contratilidade muscular e que o óxido de trimetilamina (um osmólito de ocorrência natural) desempenha um importante papel modulador deste processo.

SUMMARY

The interactions of hypertonic solutions (up to 300 mM) adjusted with sucrose, NaCl, betaine or trimethylamine N-oxide (TMAO) on potassium or caffeine induced contraction of isolated intact sartorius muscle of the frog were investigated. In saponin skinned sartorius muscle fibers of the frog we studied the interaction of caffeine and TMAO or sucrose on caffeine induced calcium release from sarcoplasmic reticulum. The potassium (40 or 100 mM) induced muscle contraction were depressed in NaCl and betaine hypertonic solutions. In sucrose and TMAO hypertonic solutions the contractions were potentiated. The caffeine induced muscle contractions were potentiated in hypertonic solutions made with any of the osmolytes. In skinned fiber experiments sucrose or TMAO didn't induce calcium release nor even potentiates the contraction induced by caffeine. These results suggested that: 1) the effects of hypertonic solutions on excitation-contraction coupling depends upon the osmolyte used; 2) the increase of intracellular ionic strength is not the only mechanism responsible for such alterations; 3) a naturally occurring osmolyte TMAO, play an important modulatory role on excitation-contraction coupling of striated muscle fibers of euryhaline animals.

1. INTRODUÇÃO

Nos animais superiores, a água ingerida alcança as regiões mais remotas do organismo via sistema circulatório. Na convecção, a água move-se em massa, juntamente com o sangue, impulsionada pela bomba cardíaca. Na difusão, o movimento da água é microscópico, impulsionado pôr gradientes de concentração. A difusão da água e a osmose são essencialmente um mesmo processo, podendo-se dizer que a osmose é um caso especial da difusão da água.

1.1 Osmose

A osmose é definida como o fluxo de água, através de uma membrana semipermeável, de um compartimento no qual a concentração do soluto não permeante seja menor para um compartimento no qual a concentração de soluto seja maior (Aires et al., 1999). É um fenômeno universal nas membranas que separam os compartimentos fluidos do organismo. Uma membrana semipermeável é definida como uma membrana permeável à água, mas impermeável aos solutos. Ocorre osmose porque a presença do soluto diminui o potencial químico da água. A água tende a fluir de onde seu potencial químico é maior para onde seu potencial químico é menor (Lang et al., 1998; Aires et al., 1999).

A diminuição do potencial químico da água (devido à presença do soluto) também reduz a pressão de vapor, diminui o ponto de congelamento e aumenta o ponto de ebulição da solução, comparados aos da água pura (Aires et al., 1999). Na figura 1, uma membrana semipermeável separa uma solução de água pura de uma solução contendo uma concentração x de soluto. A água flui do lado B para o lado A pôr osmose, visto que a presença do soluto no

lado A reduz o potencial químico da água na solução. Empurrando-se o pistão, será produzido um aumento do potencial químico da água na solução do lado A, lentificando a intensidade efetiva do fluxo osmótico da água. Se a força aplicada ao pistão for aumentada de forma gradual, eventualmente será atingida pressão na qual o fluxo efetivo de água cessará. A aplicação de pressão ainda maior fará com que a água flua na direção oposta. A pressão no lado A que é suficiente para impedir que a água pura entre no lado A é chamada de pressão osmótica da solução no lado A.

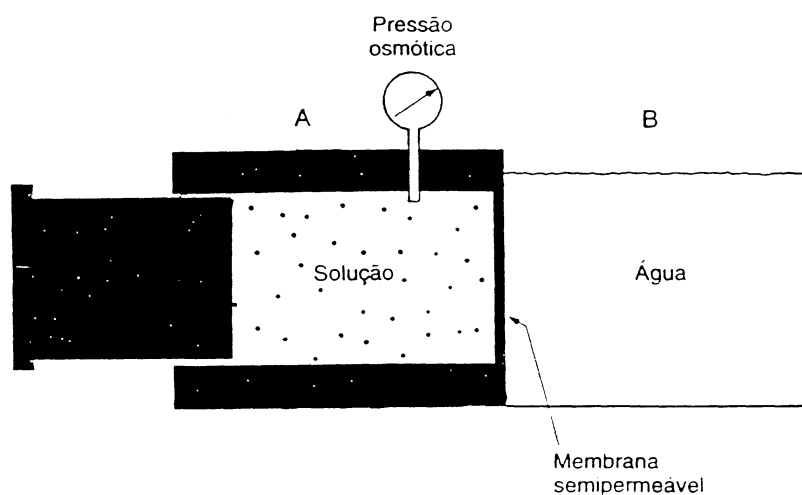


Figura 1: Dois compartimentos separados por uma membrana semipermeável. Compartimento A com solução contendo água e soluto em concentração X, e compartimento B com solução contendo somente água. Figura retirada do livro de AIRES, M. M. et al. (1999). Fisiologia. 2ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 934 p.

Para se entender adequadamente a osmose e a pressão osmótica, é indispensável uma breve definição de molaridade, osmolaridade e tonicidade. A molaridade de uma solução é definida como sendo o número de moles de soluto pelo volume da solução em litros. Define-se osmolaridade de uma solução como o número de moles de partícula osmoticamente ativas pelo volume da solução em litros, onde partículas osmoticamente ativas são aquelas dissolvidas verdadeiramente na água. Assim, a osmolaridade de uma

solução é a molaridade total das partículas nela dissolvidas. O termo tonicidade refere-se ao movimento do solvente (no caso a água) entre dois compartimentos delimitados por uma membrana permeável ao solvente e/ou ao soluto (Aires et al., 1999).

1.2 Transporte através de membranas

As membranas plasmáticas da maioria das células corporais são impermeáveis a muitos solutos do líquido extracelular e intracelular, mas são muito permeáveis à água. Consequentemente, quando a pressão osmótica do líquido extracelular é aumentada, a água sai das células por osmose e as células murcham. Quando a água sai das células, o líquido intracelular torna-se mais concentrado, até que a pressão osmótica fique igual entre os líquidos extracelular e intracelular. De modo inverso, se a pressão osmótica do líquido extracelular é diminuída, a água entra nas células. As células incham até que as pressões osmóticas intra e extracelulares voltem a se igualar.

Contrastando com os solutos impermeantes, os solutos permeantes são aqueles capazes de atravessar a membrana plasmática. Devido a essa capacidade, os solutos permeantes, devem se equilibrar através da membrana plasmática. Por essa razão, os solutos permeantes exercem apenas um efeito transitório sobre o volume celular (Yancey et al., 1982; Aires et al., 1999).

Algumas substâncias entram e saem das células por meio de proteínas intrínsecas da membrana plasmática, chamadas de carreadores ou canais. O transporte por meio de umas dessas proteínas carreadoras ou de canais é chamado de transporte mediado por proteína, ou transporte mediado. Íons e moléculas específicos podem atravessar a membrana das mitocôndrias, do retículo endoplasmático e de outras organelas por meio de transporte mediado. Por este meio a substância é transportada com maior rapidez do que as outras

moléculas com peso molecular e solubilidade lipídica semelhantes que atravessam a membrana pôr difusão simples. Existem dois tipos de transporte mediado: transporte mediado pôr carreadores e transporte mediado pôr canais. A distinção entre canais e carreadores tende a se tornar cada vez mais sutil, mas pode-se afirmar que os canais formam vias permanentes de comunicação entre os dois lados da membrana, enquanto que os carreadores expõem, alternadamente, sítios de ligação para o substrato, de um ou outro lado da membrana. É usual classificar o transporte mediado pôr carreadores nas seguintes categorias: Uniporte, onde o carreador movimenta apenas um tipo de substrato, Simporte, onde o carreador movimenta dois tipos de substrato em cada ciclo, promovendo seu fluxo no mesmo sentido, e Antiporte, onde o carreador movimenta dois tipos de substrato em cada ciclo, porém em sentidos opostos (Alberts et al., 1997; Aires et al., 1999).

O transporte mediado pôr carreadores pode ser ativo ou passivo. Embora esses processos tenham diversas propriedades comuns, a principal distinção entre eles é a de que o transporte ativo é capaz de “bombear” uma substância contra seu gradiente de concentração (ou potencial eletroquímico), enquanto que o transporte passivo tende a equilibrar essa substância nos dois lados da membrana. O transporte ativo ainda pode ser subdividido em primário, secundário e terciário. No transporte ativo primário, o fluxo do substrato é acoplado metabolicamente a uma fonte de energia, como ocorre nas ATPases transportadoras de modo geral. No transporte ativo secundário, o substrato é movimentado contra seu próprio gradiente de concentração, mas acoplado ao fluxo de um segundo substrato que se move a favor de seu gradiente de concentração ou eletroquímico. Como exemplo podemos citar o co-transporte Na-glicose, realizado em membranas luminiais de células epiteliais do intestino (Alberts et al., 1997).

Sabe-se que os íons não atravessam a membrana celular passando pela matriz lipídica, mas sim pelo interior de vias especiais, os canais iônicos, inseridos na membrana. Desta forma, os íons atravessam a membrana sem desfazer-se de seu microambiente hidrofílico. O canal iônico típico é uma grande estrutura de natureza protéica, que se estende pôr toda a espessura da membrana lipídica, tendo prolongamentos para o interior e para o exterior da célula. A principal característica de um canal iônico é a existência de uma via de passagem do íon: o poro do canal.

1.3 Principais osmólitos naturais

Muitas funções bioquímicas requerem íons inorgânicos específicos, aumentando-se a concentração destes íons acima daqueles tipicamente encontrados intracelularmente, frequentemente ocorre uma interrupção da função. Pôr exemplo, as concentrações elevadas (acima do fisiológico) dos sais KCl e NaCl possuem efeitos deletérios nas atividades de algumas enzimas de plantas e animais de diferentes habitats (Clark, 1987; Andrews et al., 1991). Estes sais afetam as reações enzimáticas e a sua aparente constante de Michaelis (K_m). Assim, altas concentrações intracelulares de sal, as quais podem ocorrer como consequência do stress osmótico, pode afetar seriamente as funções metabólicas, tanto quanto afetar a manutenção do próprio potencial transmembrana (Godt et al., 1993). A adaptação para altas forças iônicas intracelulares poderia requerer extensivas substituições de aminoácidos em muitas classes diferentes de proteínas celulares. Além disso, os fortes efeitos do sal sugerem que pode ser difícil existir uma proteína que mantenha as habilidades funcionais ótimas acima de uma ampla mudança de concentração de sal (Yancey et al., 1982). O uso de íons inorgânicos como osmólitos primários quando no stress osmótico, parece ser uma adaptação subótima,

especialmente quando comparada com as alternativas que serão consideradas a seguir.

Algumas espécies de algas acumulam níveis de glicerol acima de 4 M quando crescem em uma solução saturada de sal. Em contraste com o forte efeito deletério do KCl e NaCl, a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase nestas espécies de algas é inafetada pela alta concentração do glicerol, mesmo porque o glicerol não é importante para uma boa atividade celular. Assim foi introduzido o termo “soluto compatível” (Brown & Simpson, 1972).

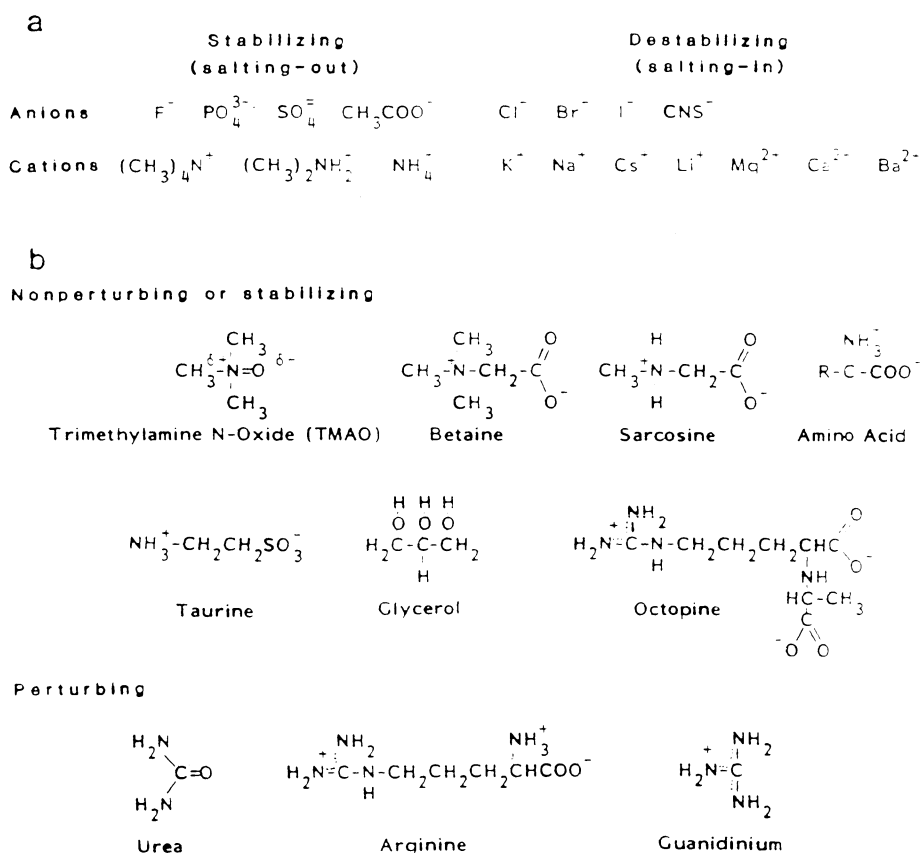


Figura 2: a) Sequência de íons da série de Hofmeister.

b) Solutos intracelulares comuns que possuem efeitos estabilizantes e perturbadores na estrutura e função das macromoléculas. Figura retirada do paper de YANCEY, P. H., CLARK, P. H., HAND, S. C., BOWLUS, R. D. & SOMERO, G. N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1222.

Os aminoácidos são os solutos dominantes filogeneticamente nos diversos organismos como as bactérias tolerantes ao sal, halófitas, invertebrados marinhos e “feiticeiras” (figura 2). Somente seletos componentes desta categoria são utilizados. Os aminoácidos contribuem significativamente para a manutenção da osmolaridade das células. Embora a concentração intracelular da maioria dos aminoácidos individualmente seja muito baixa, a soma de todos os aminoácidos contribuem significativamente para a manutenção da osmolaridade das células (Lang et al., 1998). Os osmólitos glicina, glutamina, glutamato, serina, alanina, prolina, taurina e *B*-alanina foram encontrados sem os principais efeitos de ativação ou inibição da atividade enzimática, se medidos pôr porcentagem de catálise ou influência dos valores de K_m . Embora a concentração intracelular da maioria dos aminoácidos individualmente seja muito baixa, a soma de todos livres usados no balanceamento osmótico intracelular (aproximadamente 50 a 100mM), não perturba significativamente o K_m de algumas reações enzimáticas. Em contraste, o K_m destas reações pode ser fortemente perturbado pôr dois aminoácidos básicos, a arginina e a lisina, que não são utilizados como principais osmólitos. Assim, pode-se afirmar que a arginina e a lisina são poderosos perturbadores da função enzimática. Similarmente, muitas plantas tolerantes ao sal acumulam altas concentrações de prolina como osmólito intracelular dominante (Yancey et al., 1982).

Tanto quanto os aminoácidos, numerosos metabólicos orgânicos contribuem para a regulação osmótica celular (Lang et al., 1998). A uréia é um produto importante do metabolismo e é acumulado no sangue pôr algumas espécies. Peixes marinhos cartilaginosos e o celacanto são um exemplo de animais que utilizam a uréia como osmólito, a média de concentração de uréia nestas espécies é de 400mM (Yancey et al., 1982; Heins & Inesi, 1987). A

uréia, mesmo em baixas concentrações, possui efeitos altamente perturbadores sobre as macromoléculas. É interessante acrescentar que as proteínas de animais que utilizam a uréia são tão sensíveis a perturbação deste composto, como são as proteínas homólogas das espécies que não usam a uréia como principal osmólito (Yancey et al., 1982).

Quando as metilaminas, óxido de trimetilamina (TMAO), betaina e sarcosina foram encontrados em animais que utilizam a uréia como osmólito, parte deste paradoxo de que a uréia perturbava as proteínas do animal que o utilizava foi resolvido, pois as trimetilaminas são potentes neutralizadores da perturbação da uréia, quando na proporção fisiológica de 2:1 de uréia e trimetilaminas respectivamente (Yancey et al., 1982; Altringham, Yancey and Johnsson, 1982; Meis & Inesi, 1987; Godt et al, 1993).

A neutralização metilamina-uréia tem sido demonstrada por um número grande de diferentes fenômenos protéicos, tais como os valores da K_m por várias enzimas, a exposição do grupo sulfídrico do interior da enzima, a reativação da enzima desnaturada e o desenvolvimento da tensão nas fibras musculares de tubarão. Assim, acredita-se que a adoção desse sistema de controle osmótico pelas espécies que a utilizam, tiveram a necessidade de desenvolver proteínas especialmente modificadas para funcionar na presença de altas concentrações de uréia e metilaminas. É importante saber, que em altas concentrações, tanto a metilamina como a uréia sozinhas, podem ser altamente deletérias.

As metilaminas protegem as células dos efeitos tóxicos da uréia, neutralizando estes efeitos sobre a estrutura das proteínas (Meis & Inesi, 1987). Arakawa e Timasheff (Arakawa & Timasheff, 1985) propõem que isto ocorra porque certos osmólitos podem estabilizar a estrutura protéica contra a

desnaturação, pôr serem preferencialmente excluídos da superfície destas proteínas. Isto conduz a uma hidratação preferencial da proteína quando esta sofre uma desnaturação desfavorável. Godt e colaboradores (Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993) sugerem que o TMAO neutraliza os efeitos perturbantes das altas concentrações de sal, estabilizando as pontes transversas, através dos efeitos na isomerização e/ou nos passos de ligação e separação do ciclo de pontes transversas.

Nas espécies invertebradas, as metilaminas podem neutralizar os efeitos do sal. Por exemplo, certas halofitas acumulam altas concentrações de betaina (figura 2). A betaina reverte os efeitos do sal em enzimas de plantas, e o grau de metilação do átomo de nitrogênio determiná o menor efeito das metilaminas (Pollard & Jones, 1979). Acredita-se que uma proporção de 2:1 na concentração de uréia e metilaminas também ocorrem nesses animais (Yancey et al., 1982).

Os solutos compatíveis ou não, são considerados na base de duas propriedades. Primeiro, certos solutos perturbam a interação específica com ligantes (substratos, cofatores e moduladores) e sítios ativos, portanto perturbam a função enzimática. Segundo, os modos no qual solutos compatíveis e perturbadores afetam a hidratação, solubilizando e mudando interações de vários grupos protéicos pode ser fundamentalmente diferentes, e estes efeitos estruturais podem ser traduzidos numa manifestação funcional (Yancey et al., 1982). As moléculas da água que estão organizadas ao redor das proteínas em uma solução natural, têm propriedades diferentes daquelas que estão numa solução contendo solventes orgânicos, pôr exemplo, esta solução possui uma menor pressão de vapor, menor mobilidade da água e uma grande redução no seu ponto de congelamento (Meis & Inesi, 1987).

Clark e Zounes (Clark & Zounes, 1977), foram os primeiros a mostrar a chocante similaridade entre íons que favorecem a estrutura macromolecular nativa e os grupos funcionais de muitos osmólitos orgânicos acumulados durante o stress osmótico. Aminoácidos assemelham-se com o acetato de amônio, taurina com sulfato de amônio e as metilaminas parecem íons quaternários de amônio. Acredita-se assim, que os osmólitos orgânicos estão selecionados porque eles tem efeitos estabilizantes no pareamento das macromoléculas daqueles íons favoráveis da série de Hofmeister (figura 2). Com exceção do soluto compatível prolina, todos são aminoácidos comumente acumulados e os osmólitos metilaminas aumentam a temperatura de fusão (T_f) da ribonuclease, uma vez que a T_f foi diminuída pela uréia e arginina. Novamente, as mesmas proporções de 2:1 entre uréia e metilaminas foi observado para as propriedades quinéticas e transformações estruturais. Como na lista de Hofmeister, onde o grau de metilação dos átomos de nitrogênio substituídos pelos íons de amônio aumentam suas habilidades para estabilizar as macromoléculas, o mesmo acontece para as metilaminas orgânicas (Nagy & Jenks, 1965). Entre estes, a metilamina TMAO é a mais estabilizante.

O trabalho de Hand e Somero (Hand & Somero, 1982) com a enzima tetrâmera fosfofrutokinase (PFK), indica que o TMAO favorece fortemente a agregação de PFK em politetrâmeros. O TMAO também, estabiliza a forma funcional tetrâmera do PFK, reduzindo esta dissociação em dímeros não funcional. Este efeito é alcançado com concentrações de TMAO que são cinco até dez vezes menor do que o requerido para a estabilização do íon (F⁻) da série de Hofmeister. A capacidade de várias metilaminas de estabilizar a PFK tetrâmera novamente se correlaciona com o aumento da metilação do átomo de nitrogênio (Hand & Somero, 1982).

Estudos com outros sistemas mais complexos, mostraram que a interrupção da arquitetura nativa do miofilamento induzido pôr sais neutros (KCl + NaCl) pode ser prevenido pela adição simultânea de TMAO. Aminoácidos e glicerol, também produzem estes resultados, mas a ureia não. Na verdade, a uréia altera a arquitetura dos miofilamentos em músculo de sapo (Yancey et al., 1982).

Cargas negativas sobre proteínas do miofilamento de músculo aumentam com o aumento da força iônica. Num aumento da força iônica, ocorre um grande inchaço da treliça do miofilamento e eventualmente um rompimento do miofilamento. Também devido a um aumento da força iônica há uma extração de proteínas contráteis dos filamentos finos e grossos das células musculares (Godt et al., 1993). Com a adição simultânea do aumento da quantidade de TMAO, embora não tenha havido modificação na carga protéica, o acúmulo de excesso de íons na fibra muscular e a inchação da treliça foi suprimido, e a extração de proteínas contráteis foi prevenida. Isto sugere que o TMAO induz associação de cátion nos sítios fixos de ligação de carga. No caso de proteínas do miofilamento, ao menos alguns dos efeitos de osmólitos podem ser mediados diretamente na superfície biopolímera, ou pelo modo de hidratação pela água da primeira camada (Yancey et al. 1982; Godt et al, 1993).

Clark em 1987 (Clark, 1987), estudando os efeitos da água e íons livres sobre a molécula do TMAO, sugeriu que em uma solução de KCl contendo uma concentração de 0,5M de TMAO, ocorre uma redução da atividade do K^+ em 30 % e do Cl^- em 5 % (medidos com eletrodos ion-seletivos). Este efeito parece ser devido ao sequestro de íons, especialmente cátions; nos arredores da enorme molécula polar fazendo com que estes íons sejam menos capazes de interagir com as proteínas, e assim protegendo-as de uma possível

desnaturação (Clark, 1987). Godt e colaboradores em 1993, sugeriu que este efeito estabilizante e protetor das proteínas, poderiam ter muitas consequências, entre elas o TMAO diminuiu os efeitos da força iônica intracelular, neutralizou os efeitos dos sais, como exemplo podemos citar a uréia, estabilizando as pontes transversas, além de possuir um poder de não deixar que a miosina e troponina C sejam extraídas do músculo (Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993).

Em contraste, certos osmólitos agem na mudança das propriedades solventes da água. Pôr exemplo, Gekko e Timasheff (Gekko & Timasheff, 1981), mostraram que adicionando-se glicerol numa solução protéica termodinamicamente favorável, uma minimização da interação proteína-solvente (água mais glicerol), e da interação proteína-proteína (agregação das subunidades e conformação nativa) acontecerá. Além disso, Arakawa e Timasheff (Arakawa & Timasheff, 1985), propõem que certos osmólitos podem estabilizar a estrutura da proteína contra a desnaturação, pôr serem excluídos preferencialmente da superfície da mesma. Isto conduz a uma hidratação preferencial da proteína que fez desnaturação termodinamicamente desfavorável (Arakawa & Timasheff, 1985).

O fato de que organismos filogeneticamente diversos como bactérias, algas unicelulares, plantas vasculares, invertebrados e vertebrados utilizarem uma pequena família de osmólitos orgânicos (figura 2) sugere que fortes pressões seletivas estão associados com este impressionante exemplo da evolução convergente. Para se entender estes fatores seletivos deve-se fazer um breve exame nas exceções às regras elaboradas nas discussões de sistemas de soluto compatível (Yancey et al., 1982).

As halobactérias são uma exceção dramática das estratégias osmóticas encontradas dentre todos os outros organismos contemporâneos. Este antigo

grupo de procariontes ajusta-se osmoticamente em ambientes onde a concentração de sal atinge níveis saturados. Uma concentração intracelular de K^+ de aproximadamente 7M foi encontrada em algumas espécies de halobactérias (Lanyi, 1974). Isto aumenta a questão entre custos e benefícios das estratégias osmóticas, e porque a seleção natural em outras espécies ajustadas osmoticamente não foi adotada pelo halofilo como estratégia.

Muitas enzimas de outras espécies de halobactérias são fortemente inibidas pelo KCl e NaCl em concentrações maiores do que 0,1 até 0,2 M. Para alcançar esta tolerância ao sal, as proteínas de halobactérias receberam maciças substituições de aminoácidos, envolvendo enriquecimento com aspartil, glutamil e fracos resíduos hidrofóbicos (Lanyi, 1974). Estas substituições tem proporcionado para as proteínas deste halofilo um suporte no estado conformacional e nas propriedades funcionais em altas concentrações de K^+ . Muitas enzimas de halobactéria requerem concentrações de 1M ou mais de sal para alcançar o seu pico de atividade (Lanyi, 1974), e desta maneira as halobactérias estão estritamente confinadas somente nestes ambientes, que apropriadamente, tem sempre alta salinidade. Em contraste, as espécies de *dunaliella* em geral, sem tal modificação em suas proteínas podem crescer bem em ambos os ambientes, salmoura e soluções muito diluídas. Isto porque a pressão osmótica interna é controlada pôr um soluto compatível (Yancey et al., 1982).

A avaliação dos efeitos de osmólitos de ocorrência natural na atividade de muitas enzimas tem sido realizada em vários estudos. Contudo poucos estudos tem sido realizado em sistemas mais complexos e em condições fisiológicas. Altringhan e colaboradores (Altringhan, Yancey and Johnston, 1982) demonstraram que o TMAO foi eficiente em contrabalançar os efeitos

deletérios da uréia em músculo de peixes. Até o presente momento, nenhum estudo tem sido feito em músculo esquelético intacto.

1.4 Estrutura do músculo esquelético

As fibras musculares são formadas durante o desenvolvimento embrionário pela fusão de muitas células isoladas, dando origem assim a células polinucleadas os quais se localizam logo abaixo da membrana plasmática. No citoplasma encontram-se, além dos núcleos, mitocôndrias, retículo plasmático liso e rugoso e retículo sarcoplasmático. As miofibrilas são os elementos contráteis da célula muscular (Alberts et al., 1997), sendo estruturas cilíndricas com 1 a 2 μ m de diâmetro e apresentam uma disposição longitudinal à fibra muscular (Junqueira & Carneiro, 1999).

As miofibrilas, ao microscópio óptico, aparecem com estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras. Esta estriação da miofibrila é devido à repetição de unidades morfofuncionais, chamadas sarcômeros. Ao microscópio de polarização, a faixa escura foi denominada banda A pôr ser anisotrópica, e a faixa clara denominada banda I pôr ser isotrópica (Junqueira & Carneiro, 1999). A banda I é mais clara pelo fato de possuir somente filamentos finos, enquanto que a banda A é mais escura, pois neste local a miofibrila possui uma região onde se encontram sobrepostos os filamentos finos e grossos. No centro de cada banda I existe uma linha escura, denominada linha Z, delimitando os sarcômeros (Huxley & Hanson, 1954; Huxley, 1957). A banda A apresenta uma zona mais clara no seu centro, a banda H que é um local onde estão presentes apenas filamentos grossos sem sobreposição com os filamentos finos. No centro desta banda H existe uma linha central chamada linha M (Garret & Grishan, 1995).

Cada sarcômero compreende uma unidade altamente organizada, de filamentos paralelos e parcialmente sobrepostos. Os filamentos finos são compostos principalmente por actina, que é uma proteína globular com 43 kD de massa que em meio de força iônica fisiológica se apresentam sob a forma de polímeros longos torcidos em hélice dupla. Existem outras proteínas associadas a estes filamentos finos além da actina, como a distrofina, que liga os filamentos de actina a proteínas integrais da membrana plasmática (Junqueira & Carneiro, 1999). Outra proteína associada é a nebulina (Shih et al., 1997), que estendendo-se de uma extremidade a outra do filamento de fino acredita-se atuar como uma “régua molecular” para manter a organização da actina e o comprimento dos filamentos durante o desenvolvimento da força muscular (Alberts et al., 1994; Millevoi et al., 1998; Zhang et al., 1998). Enquanto que a distrofina e a nebulina possuem função estrutural, existem outras proteínas que exercem, juntamente com a actina, função regulatória da atividade contrátil. São elas a tropomiosina e a troponina. A tropomiosina é uma molécula em forma de bastão que se liga ao filamento de actina e é formada por duas cadeias polipeptídicas enroladas uma sobre a outra (Chalovich, 1992; Cooke, 1997; Gordon, Homsher and Regner, 2000). A troponina é importante no fenômeno da contração muscular por estar envolvida na regulação pelo cálcio, da interação acto-miosina de músculos estriados. Ela é formada por um complexo de três subunidades, as troponinas T, I e C (Leavis & Gergely, 1984). O complexo da troponina apresenta uma forma alongada, na qual as subunidades C e I formam uma região globular, e a T é uma longa cauda responsável pela ligação do complexo troponina-tropomiosina ao filamento fino. A troponina I está envolvida na inibição da interação actina-miosina, e a troponina C apresenta dois sítios específicos com alta afinidade pelo cálcio e mais dois sítios inespecíficos com baixa afinidade

tanto pelo íon cálcio quanto pelo íon magnésio. Quando ocorre a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, o cálcio compete com o magnésio pelo sítio inespecífico da troponina C, mudando a conformação do complexo troponina-tropomiosina, e liberando assim, o sítio de inibição de ligação da miosina à actina (Saleh et al., 1986; Stromer, 1992; Potter et al., 1995; Ramos et al., 1999).

Os filamentos grossos são constituídos principalmente pôr miosina (Moss & Hofmann, 1992). A molécula da miosina tem massa molecular de aproximadamente 200kD, apresentando uma porção em forma de bastão com 20nm de comprimento e 2-3nm de diâmetro. É uma molécula formada pôr uma cadeia polipeptídica enrolada em dupla hélice (cauda da miosina) e uma cabeça globular. Esta cabeça globular da miosina possui locais específicos para a ligação com ATP e é dotada de atividade ATPásica. A cabeça da miosina projeta-se perpendicularmente em relação a sua cauda, apresentando um sítio de interação com a actina. A interação da cabeça da miosina com a actina durante o processo de contração muscular é responsável pela geração de força e/ou deslizamento dos filamentos finos (Moss & Hofmann, 1992; Alberts, et al., 1994). Outra importante proteína constituinte do filamento grosso é a titina, que é o mais longo polipeptídeo descrito até hoje. Suas moléculas têm forma de corda e se estendem desde o filamento grosso até a linha Z; imagina-se que possuem função de manter os filamentos grossos centralizados no sarcômero (Alberts, et al., 1994).

1.5 Funcionamento do músculo esquelético

Fisiologicamente, a contração dos músculos esqueléticos está sob o comando dos nervos motores, estes tem os seu corpo celular localizado na medula. Os motoneurônios ao chegarem ao tecido conjuntivo do perimísio,

originam inúmeras ramificações em que estão justapostos a uma área especializada da membrana da fibra muscular esquelética formando assim, a placa motora (Linden, 1999). A terminação axônica é amielínica e apresenta numerosas mitocôndrias e vesículas sinápticas contendo a acetilcolina, um conhecido neurotransmissor (Heuser & Reese, 1973). Quando há a liberação da acetilcolina pelas vesículas sinápticas, esta se difunde através da fenda sináptica e vai se ligar a receptores situados no sarcolema das dobras juncionais da membrana pós-sináptica. Esta ligação da acetilcolina com os receptores faz com que a membrana da fibra muscular (sarcolema) fique mais permeável ao sódio e ao potássio. Como o gradiente eletroquímico para o sódio é maior do que para o potássio, o primeiro se difundirá mais rapidamente pela membrana da fibra muscular esquelética, resultando na despolarização do sarcolema, dando origem ao potencial de placa motora (Bourne & Nicoll, 1993).

Esta despolarização poderá originar um potencial de ação o qual propaga-se ao longo da membrana da fibra muscular e penetra na fibra através dos túbulos transversos, ou túbulos T, que são invaginações da membrana da fibra muscular esquelética. Os túbulos T estão presentes em intervalos regulares ao longo do sarcolema (Garret & Grishan, 1995), permitindo assim, que o sarcolema tenha funcionalmente estreita associação com as porções terminais de cada sarcômero presente na fibra muscular estriada. Assim a frente da onda de despolarização alcança as porções mais profundas das células musculares desencadeando assim o processo contrátil do músculo de forma homogênea. Os receptores diidropiridínicos (DHP), são proteínas que têm este nome devido a sua alta afinidade pôr compostos diidropiridínicos, tais como nifedipina e nitrendipina (agentes que bloqueiam a atividade destes canais), estão presentes na membrana dos túbulos T e funcionam como canais

de cálcio (Rios and Brumm, 1987). Os receptores DHP apresentam em sua molécula um seguimento transmembrana que são sensíveis à variação de voltagem. Acredita-se que estes receptores, juntamente com outra proteína (receptores da raionadina) presente na membrana da sisterna terminal do retículo, sejam essenciais ao fenômeno de transdução do sinal elétrico à liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático num processo descrito como o da excitação-contração (Rios & Pizarro, 1991; Cognard et al., 1992; Zou et al., 1995; Tavernier et al., 1994; Xu et al., 1996).

O retículo sarcoplasmático é constituído pôr duas regiões, denominadas túbulos longitudinais que percorrem paralelamente o sarcômero, e as cisternas terminais que estão justapostas aos túbulos T. O conjunto formado pôr duas cisternas terminais, justapostas a um túbulo T é denominado tríade (Block et al., 1988; Franzini-Armstrong & Nunzi, 1983). A transdução do sinal elétrico a partir dos receptores DHP é realizada, provavelmente graças à projeção de parte da molécula do canal de cálcio existente na membrana do retículo sarcoplasmático (Xu et al., 1996). Estudos de microscopia eletrônica demonstram estreita associação entre esta proteína que apresenta a forma de pé, e os receptores DHP. A droga raionadina liga-se especificamente aos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, e pôr esta razão estas estruturas são classificadas como receptores raionadínicos (Ashely et al., 1991; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Os receptores raionadínicos (RYR) são conhecidos como canais de cálcio devido à existência de uma atividade intrínseca liberadora de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Estes canais, quando abertos, permitem a saída de íons cálcio dos estoques das cisternas do retículo sarcoplasmático para o mioplasma (Rios & Pizarro, 1991; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997; Fill & Best, 1998).

Os receptores DHP são heteropentâmeros (figura 3), constituídos de cinco subunidades protéicas: α_1 , α_2 , β , γ e δ (Blaise, 1995; Leong & MacLennan, 1998). A subunidade α_1 é estruturalmente semelhante aos canais de sódio voltagem-dependentes, e é a porção da molécula sensível a diidropiridina (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997; Leong & MacLennan, 1998). A função das demais subunidades não encontra-se totalmente esclarecida. Em músculos estriados esqueléticos a alça citoplasmática existente entre os domínios II-III da subunidade α_1 dos receptores DHP é importantíssima para o mecanismo de acoplamento excitação-contração, pois realiza interações com os receptores RYR (Tanabe et al., 1990; Leong & MacLennan, 1998; Zhu et al., 1999). A alça III-IV também apresenta um papel fundamental no mecanismo de acoplamento excitação-contração, pois a interação entre os receptores RYR1 e esta alça apresenta um papel de inativação da liberação de íons cálcio pôr meio dos receptores RYR1, durante a repolarização do sarcolema (Leong & MacLennan, 1998).

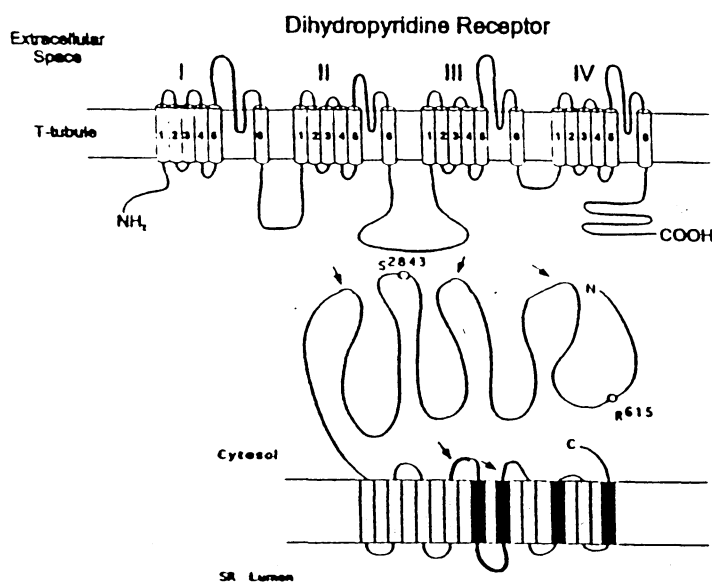


Figura 3: Estrutura dos receptores DHP e RYR. Figura montada com os papers: MEISSNER, G. (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 485-508. RIOS, E. & PIZARRO, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Review.* 61, 849-908.

Os receptores rianodínicos pertencem a uma família de canais de cálcio que apresenta papel fundamental na regulação da concentração intracelular de íons cálcio (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997). Estes receptores são homotetrâmeros formados por subunidades que apresentam massa molecular de aproximadamente 560kD e estão situados na cisterna terminal do RS de células musculares estriadas e outros tipos celulares (MacLennan, 1998). As junções entre a membrana do RS e as membranas externas permitem interações entre os RYR e proteínas de superfície, os receptores DHP como mostra a figura 3 (Hille, 1992).

1.6 Atuação do íon cálcio na contração muscular

É conhecido que o cálcio e outros cátions divalentes agem como estabilizantes na membranas excitáveis, e devido a mudanças da concentração extracelular de cálcio podem ocorrer alguns efeitos na excitabilidade das fibras musculares esqueléticas. Oota e colaboradores (Oota, Kosaka, Nagai e Yabu, 1981) trabalharam com a contratura potássica em rã, e concluíram que em uma solução sem cálcio, a contratura potássica é eliminada. Isto sugeriu que a concentração de cálcio extracelular e no sarcolema são necessárias para manter o mecanismo AEC em fibras musculares esqueléticas com um bom funcionamento. Quando o cálcio entra através do sarcolema durante a despolarização da membrana, serve como um disparador de uma segunda liberação de cálcio do RS, conhecida como liberação cálcio induzida por cálcio (LCIC) (Endo et al., 1970; Bianchi & Bolton, 1977).

Com isso podemos constatar que a ativação da contração muscular depende da presença de íons cálcio no meio intracelular (Wier & Yue, 1986; Ashley et al., 1991; Sipido & Wier, 1991; Wier & Blatter, 1991). Estes íons ao se ligarem a sítios de baixa afinidade existentes na molécula da troponina C,

induzem modificações conformacionais do complexo troponina-tropomiosina permitindo a interação cíclica das pontes transversas da miosina com a actina a qual resulta na produção de força pelo sistema contrátil, ou encurtamento desse (Brenner, 1986; Guth & Potter, 1987; Goldman & Brenner, 1987; Sheng et al., 1991; Brenner, 1991; Strang & Potter, 1992; Lee et al., 1995). O relaxamento muscular é obtido graças a mecanismos de transporte ativo do íon cálcio do citoplasma para as organelas citoplasmáticas (principalmente para o retículo sarcoplasmático) e de mecanismos de transporte iônico acoplado (principalmente o sistema de troca Na^+ - Ca^{++}) existentes na membrana citoplasmática (Ashley et al., 1991; Allen & Chapman, 1995; Ye & McArdle, 1996).

A Ca^{++} -ATPase das vesículas do RS podem catalizar ambos, a hidrólise e a síntese de ATP. Durante a hidrólise do ATP, o Ca^{++} é acumulado pelas vesículas do RS, e no processo inverso, síntese de ATP, o Ca^{++} é liberado da vesículas rapidamente. A síntese do ATP é iniciada pela fosforilação do ATPase pelo fósforo inorgânico P_i , formando um resíduo de acilfosfato no sítio catalítico da enzima. A afinidade do P_i varia com a variação do pH, ou seja a reação de fosforilação é dependente do pH. A fosforilação da Ca^{++} -ATPase pelo P_i , ocorre mais rapidamente em pH ácido do que em pH alcalino. Em estudos realizados por Meis e Inesi, em 1987 com vesículas isoladas do RS do músculo esquelético de coelho, mostraram que as metilaminas aumentam moderadamente os níveis da fosfoenzima (pH 6.2), e continuam aumentando com a adição de mais 0.4 M de TMAO ou 2M de betaina (pH 7.6). Os efeitos da uréia sobre a Ca^{++} -ATPase foram antagônicos àqueles adquiridos pelas metilaminas, ou seja, as metilaminas diminuíram a aparente K_m para o P_i , enquanto que a uréia aumentou. Os efeitos da uréia foram cancelados quando os autores do referido trabalho adicionaram metilaminas

em proporção de 1:1 (Meins & Inesi, 1987). Alguns pesquisadores propuseram que as metilaminas poderiam servir de proteção para certas células dos efeitos tóxicos da uréia, protegendo a estrutura da proteínas (Yancey et al., 1982; Meins and Inesi, 1987; (Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993). Meins e Inesi sugeriram que protegendo as células dos efeitos tóxicos da uréia, as metilaminas poderiam estar envolvidas na regulação da afinidade do P_i pela Ca^{++} -ATPase (Meins & Inesi, 1987).

Além do acoplamento elétrico entre os receptores da diidropiridina e os receptores da raionidina, outros mecanismos foram também propostos para explicar a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Estudos demonstram que a partir da despolarização do sarcolema, a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático poderia ser ocasionada pela presença de mediadores intracelulares como o trifosfato de inositol (IP_3) (Valdivia et al., 1992; Vergara et al., 1985; Missiaen et al., 1992). Inúmeros trabalhos demonstram que este composto pode estar envolvido na liberação de íons cálcio de estoques intracelulares de músculo liso e de outros tipos celulares (Harootunian et al., 1991; Peres et al., 1991; Finch et al., 1991; Rojas et al., 1992; Zhang et al., 1993; Watanabe et al., 1996). Alguns estudos demonstraram que em músculo estriado o trifosfato de inositol provavelmente promove contratura pôr induzir a mobilização de um “pool” de íons cálcio o qual não é mobilizado pela cafeína (Rojas et al., 1992). Seu papel na liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático de células de músculo esquelético e cardíaco permanece contudo, controverso (Ashley et al., 1991).

Menos controverso tem sido a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático induzido pela cafeína (Rousseau & Meissner, 1989; Foskett & Wong, 1991; Busselen et al., 1991; Kannan et al., 1991; Meissner et al. 1991; Schalck et al., 1994). Acredita-se que esta droga promove a abertura dos

canais de cálcio do retículo sarcoplasmático pôr um mecanismo similar ao da “liberação de cálcio induzido pôr cálcio” (Aschely et al., 1991; Su & Chang, 1993; Kannan et al., 1996). A existência de procedimentos experimentais que possam afetar o processo de acoplamento excitação-contração em suas diversas etapas, pode ser de grande importância para o esclarecimento deste processo. Pôr exemplo, estudos demonstram que o íon perclorato (ClO_4^-), quando em baixas concentrações ($< 10\text{mM}$), induz potencialização da contratura potássica (K^+) (Györke & Palade, 1992; Dulhunty et al., 1992; Gallant et al., 1993; Oba et al., 1997) sem alteração do potencial de membrana induzido pelo potássio. Este efeito parece não ser decorrente da ativação dos canais de cálcio existentes no retículo sarcoplasmático, e sim de modificações ao nível dos receptores DHP os quais tornar-se-iam mais sensíveis a despolarização da membrana do sistema tubular transverso (Györke & Palade, 1992; Oba et al., 1997). Tem sido demonstrado também que o íon perclorato potencializa os efeitos da cafeína e acredita-se que este efeito seja decorrente não de um efeito direto desse íon ao nível dos receptores de RYR e sim ao nível dos receptores DHP (Oba et al. 1997). Estes dados sugerem a existência de um acoplamento funcional entre os receptores DHP e os receptores RYR. Assim a descoberta de novas substâncias ou procedimentos como a alteração na tonicidade do meio extracelular, que possam interferir no processo de acoplamento excitação-contração de músculo esquelético, poderá ser de grande importância para a elucidação desse fenômeno.

1.7 Teorias para explicar o comportamento do músculo esquelético quando em contato com soluções hipertônicas

Neste momento é importante um breve relato, do comportamento do músculo esquelético quando em contato com soluções de diferentes tonicidades. Algumas teorias e pesquisas foram importantes para a elucidação de alguns pontos relacionados com a hipertonicidade e o músculo esquelético.

Caputo avaliou os efeitos de soluções hipertônicas no músculo esquelético. Nos anos 60, este pesquisador verificou que incubando-se o músculo esquelético em uma solução hipertônica, houve potencialização das contraturas cafeínicas e induzidas pôr KCl. Baseado nos resultados obtidos o autor suger que esta potencialização é devido a um efeito das soluções hipertônicas sobre o mecanismo de acoplamento excitação-contração do músculo esquelético. Estas alterações do processo de acoplamento excitação-contração alteram as respostas mecânicas ao estímulo elétrico e à despolarização induzida pelo potássio (Caputo, 1966). Em 1968, Caputo verificou que o aumento da força iônica no interior das fibras musculares, causada pela perda de água quando o músculo é exposto a uma solução hipertônica, poderia afetar diretamente os mecanismos contráteis. Mas pôr outro lado as mudanças na estrutura do retículo sarcoplasmático, que ocorrem quando o músculo é exposto a soluções hipertônicas, poderia afetar o mecanismo de acoplamento excitação-contração. Isto seria explicado quando fibras musculares são expostas a soluções hipertônicas com o dobro de sua tonicidade normal. Neste caso a contratura cafeínica não é reprimida e sim, potencializada (Caputo, 1968).

Nas décadas de 50 e 60, muitas pesquisas foram realizadas abordando os efeitos de soluções hipertônicas na musculatura esquelética. Alguns pesquisadores constataram que o maior efeito das soluções hipertônicas em

fibras musculares esqueléticas é a diminuição da tensão, não importando o método de estimulação usado (Gordon & Godt, 1970; Lännergren & Noth, 1973; Mansson, 1989; Lamb, Stephenson and Stienen, 1992). Mansson demonstrou que a redução de força promovida pôr essas soluções ajustadas com NaCl em fibras intactas de rã, não foi acompanhada pôr redução dos valores de elastância, sugerindo que a diminuição de força ocorre como consequência da redução na força produzida pôr unidade de pontes transversas e não do número das mesmas (Mansson, 1989). As soluções hipertônicas podem estar atuando diretamente nas proteínas contráteis do músculo esquelético, como também no espaçamento das treliças do filamento, quando expostos a um aumento da força iônica (Gordon & Godt, 1970; Homsher, Briggs & Wise, 1974; Piazzesi, Linari and Lombardi, 1994). Lamb sugere que efeito do direto do aumento da força iônica no aparato contrátil é devido uma diminuição da sensibilidade do mesmo ao íon cálcio (Lamb, Stephenson and Stienen, 1992). No entanto, Godt (Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993) em pesquisa realizada em fibras desmembranadas com o uso de triton 100, sugere que a relação entre força de contração induzida pôr íons cálcio e força iônica é dependente do sal usado para alterar a força iônica, e que quando o TMAO é adicionado a solução ocorre um aumento da força máxima, especialmente em soluções de alta concentração de KCl (Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993).

Além disso, as soluções hipertônicas poderiam provocar uma disrupção do mecanismo de acoplamento excitação-contração, e assim ocasionando uma diminuição na liberação de cálcio livre no mioplasma, ou ainda aumentar a eficiência na sequestração de cálcio efetivo pelo retículo sarcoplasmático (Gordon & Godt, 1970; Homsher, Briggs and Wise, 1974; Coutinho, Bragada-Costa and Suarez-Kutz, 1982). Lännergren e Noth (Lännergren & North,

1973), em 1973 sugeriram duas possibilidades de como as soluções hipertônicas estariam agindo no mecanismo de acoplamento excitação-contracção do músculo esquelético. A primeira sugestão é que os elementos longitudinais do retículo sarcoplasmático suportam o aumento da inchação. A outra alternativa é que o aumento interno da concentração de íons, que resultaram da redução do volume da fibra, altera a propriedade que o RS tem de acumular cálcio (Lännergren & North, 1973; Valdiosera, Clausen & Eisenberg, 1974). Lamb e colaboradores (Lamb, Stephenson and Stienen, 1992), trabalhando com fibra muscular isolada de rã na presença de sacarose, verificaram que estes efeitos inibitórios de despolarização induzindo a liberação de cálcio do RS no mecanismo AEC, é devido a um aumento da concentração de Mg^{2+} , que irá competir com o cálcio pelo sítio de ligação na troponina C (Lamb, Stephenson and Stienen, 1992).

Homsher (Homsher, Briggs and Wise, 1974) sugeriu que o mecanismo de inibição do desenvolvimento da tensão pela elevação da força iônica, poderia ser devido a um aumento do “efeito residual” nestes níveis de força iônica, devido provavelmente, a uma redução da formação das pontes transversas, no estado produtor de força (Homsher, Briggs and Wise, 1974; Mansson, 1989; Piazzesi, Linari and Lombardi, 1994). Este pesquisador, não obteve os mesmos resultados obtidos por Caputo (1966), o qual demonstrou que soluções hipertônicas provocam uma potencialização da contratura cafeínica. Homsher e colaboradores (Homsher, Briggs and Wise, 1974) verificaram que aumentando-se a força iônica com glicerinato ocorreu uma diminuição da tensão máxima (Homsher, Briggs and Wise, 1974; Godt, Kirby and Gordon, 1984). Aumentando-se a hipertonicidade de uma solução em 2,5 vezes do normal com sacarose, Valdiosera e colaboradores, mostraram que ocorre um pequeno valor de condutividade luminal, sugerindo que a existe

uma separação entre as membranas do sistema tubular e do retículo sarcoplasmático. Esta separação poderia afetar o mecanismo de acoplamento excitação-contração do músculo esquelético (Gordon & Godt, 1970; Valdiosera, Clausen and Eisenberg, 1974). Valdiosera (Valdiosera, Clausen and Eisenberg, 1974) trabalhando com músculo sartório de rã, sugeriu que o mecanismo de AEC estaria sendo afetado devido a dificuldade na geração do potencial de ação através da membrana tubular em experimentos de clampeamento de voltagem, especialmente na presença de corrente interna de sódio através da membrana tubular (Valdiosera, Clausen and Eisenberg, 1974). Guilherme Suarez-Kurtz em seu trabalho de 1977, utilizando fibras musculares de carangueijo, também concluiu que as soluções hipertônicas atuam principalmente a nível de túbulos transversos, onde ocasionam uma mudança morfológica nessa organela, inibindo assim o mecanismo AEC, e consequentemente uma diminuição das respostas contráteis do músculo. Esta diminuição da resposta de despolarização da membrana foi induzida tanto por pulsos de corrente externa, como por elevação da concentração extracelular do potássio (Suarez-Kurtz & Sorenson, 1977; Coutinho, Braga-da-Costa and Suarez-Kurtz, 1982).

Quando o músculo esquelético é incubado numa solução hipertônica, algumas modificações morfo-funcionais acontecem nas estruturas das células musculares. O sistema de túbulos T incham pela adição na solução de sacarose ou cloreto de sódio, mas isto não ocorre com o RS (Franzini-Armstrong et al., 1978; Chawla et al., 2001). Franzini-Armstrong sugere que esta inchação seja devido aos túbulos T estarem em comunicação com o espaço extracelular. Isto já não ocorre com o RS provavelmente porque esta organela está isolada do espaço extracelular (Franzini-Armstrong et al., 1978). Vacúolos contendo solutos extracelulares apareceram ao longo da linha Z (Somlyo, Shuman and

Somlyo, 1977). Franzini-Armstrong em estudos posteriores sugeriu que estes vacúolos fazem parte do sistema de túbulos T (Franzini-Armstrong et al., 1978).

As soluções hipertônicas afetam o músculo esquelético de inúmeras maneiras. Kita em 1977(Kita & Van Der Kloot, 1977), trabalhando com o nervo ciático do músculo sartório de rã incubados com sacarose, sugeriu que as soluções hipertônicas diminuem o número de sítios de ligação de cálcio dentro dos terminais nervosos motores, o que poderia como consequência, diminuir a resposta contrátil do músculo (Kita & Van Der Kloot, 1977).

Em 1982, Coutinho pesquisando fibra isolada do músculo semitendinoso de rã, e aumentando a tonicidade da solução com sacarose e cloreto de sódio, sugeriu que em soluções hipertônicas a tensão isométrica, abalo e a tensão tetânica são inibidas (Vaughan, Dusik and Trotter, 1982; Coutinho, Braga-da-Costa & Suarez-Kutz, 1982). Estes autores atribuem tais mudanças à sensibilidade do mecanismo AEC, e também ao aumento da força iônica na fibra muscular, como também a redução da atividade da enzima ativadora da actina S_1 -ATPase.

A diminuição do espaço entre os filamentos ocasionado pelo aumento da força iônica poderia também explicar a redução da produção de força induzida pelos íons cálcio e uma consequente redução da força desenvolvida (Clark, 1987). Vaughan e Coutinho acreditam que ocorra, sob essas condições, uma mudança no ângulo da cabeça da miosina, ocasionando um impedimento da miosina se ligar a actina, e consequentemente o ciclo de rotação e tensão desenvolvidas são suprimidas (Vaughan, Dusik and Trotter, 1982; Coutinho, Braga-da-Costa & Suarez-Kutz, 1982). Já Mansson sugeriu que a força produzida pôr unidade de pontes transversas seria reduzida, em consequência do aumento na força iônica do meio intracelular, não havendo contudo

redução no número de pontes transversas presentes em cada ciclo produtor de força (Mansson, 1989; Piazzesi, Linari & Lombardi, 1994).

Em recente trabalho publicado, Chawla e colaboradores demonstraram que aumentando-se a tonicidade da solução com 350mM de sacarose, em músculo esquelético de rã, obtêm-se uma onda de liberação de cálcio. Estas ondas de cálcio persistem em fibras expostas à soluções contendo EGTA, mesmo durante uma despolarização sustentada da membrana e também quando as fibras são expostas à nifedipina (bloqueador dos receptores DHP). Estas ondas de cálcio são bloqueadas pelos agentes específicos da RYR (bloqueadores de canais RYR), mas são potencializadas com cafeína (Chawla et al., 2001). Os dados obtidos pôr estes autores sugerem que o processo de liberação de Ca^{++} do RS é o principal passo afetado pôr soluções hipertônicas.

Estas recentes evidências experimentais demonstram que o processo AEC, bem como o processo de ativação do sistema contrátil são afetados pôr exposição de fibras musculares esqueléticas à soluções de diferentes tonicidades. Contudo os mecanismos pêlos quais a tonicidade afeta a produção de força pelo músculo não estão totalmente esclarecidos.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 GERAL

Avaliar os efeitos de soluções de diferentes tonicidades (ajustadas por diferentes osmólitos) no fenômeno da contração muscular.

1.8.2 ESPECÍFICOS

1. Investigar empregando-se o músculo esquelético de anfíbio, os efeitos de soluções hipertônicas (ajustadas com sacarose, NaCl e TMAO) na contração muscular induzida por despolarização da membrana promovida por potássio.
2. Avaliar os efeitos de soluções hipertônicas (ajustadas com sacarose, NaCl e TMAO) na contratura induzida por cafeína.
3. Avaliar os efeitos de soluções hipertônicas (ajustadas com TMAO) na contratura induzida por perclorato em soluções contendo 40mM de potássio.
4. Avaliar o efeito do TMAO na liberação de íons cálcio no RS de fibras musculares esqueléticas da rã, permeabilizadas com saponina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução do presente trabalho empregaram-se rãs do gênero e espécie *Rana catesbiana*, de ambos os sexos, adquiridas de um fornecedor local e mantidas no biotério da UFPR. Estes animais foram alimentados “ad libitum”. O estudo foi realizado em músculo sartório de rã, de espécie já mencionada, que após terem sido desmeduladas e descerebradas, tiveram seus músculos sartórios dissecados. Estes foram mantidos em solução Ringer, oxigenada pôr borbulhamento de ar, com a seguinte composição (em mM): NaCl 110,0; KCl 4,0; MgCl₂ 1,8; CaCl₂ 2,0; Trizma 10,0 e o pH entre 7,2 e 7,5 ajustado com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. A seguir para cada condição experimental foi realizado:

2.1 Músculo intacto

Os músculos isolados foram colocados em câmaras verticais, contendo solução de Ringer, a temperatura ambiente (24-26° C). Uma das extremidades do músculo foi mantido em posição estacionária, e a outra extremidade do músculo foi fixada a um sistema de alavancas isotônicas, e as respostas contráteis registradas em quimógrafos (Zimmermann Leipzig nº 1878). Na solução contendo alta concentração de KCl este substituiu isosmoticamente o NaCl. As substâncias cafeína, TMAO, betaína e sacarose, foram adicionadas diretamente na solução. O perclorato foi empregado na forma de NaClO₄⁻. Após a adição destas substâncias, foi verificado o pH das soluções e corrigido quando necessário, utilizando HCl ou KCl para ajustar o pH para 7,4.

2.2 Protocolo experimental

Inicialmente foram promovidas duas contraturas potássicas (KCl 100mM) e a seguir a preparação foi incubada pôr 20 min, com Ringer normal (4mM KCl) na qual adicionou-se TMAO, betaina, sacarose ou NaCl nas várias concentrações (50mM, 100mM, 200mM ou 300mM). Após o término do tempo de incubação substituímos a solução em Ringer normal contendo os osmólitos a serem estudados, pôr Ringer 100 (KCl 100mM) contendo TMAO, betaina, sacarose ou NaCl para obtermos uma relação entre concentração-efeito. Os dados obtidos foram normalizados para os valores de encurtamento muscular obtido em 100mM de potássio. Em todas as soluções usadas, foi medido a osmolaridade, empregando-se um micro-osmômetro de vapor de pressão (WESCOR 5520). Os valores de osmolaridade estão demonstrados na tabela 1.

Com o objetivo de estudarmos os efeitos de osmólitos de ocorrência natural nos mecanismos de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático empregamos a cafeína, uma substância que induz a liberação deste íon desta organela. Realizamos inicialmente uma curva dose-resposta para a cafeína, para podermos selecionar àquela capaz de induzir encurtamento muscular submaximal. Para tal, as preparações foram expostas a concentrações crescentes de cafeína. A cada incremento de 0,5mM de concentração de cafeína, esperamos que as preparações atingissem o estado estacionário de encurtamento, o que ocorreu em aproximadamente 20 minutos. A concentração de 2mM de cafeína foi capaz de induzir contração muscular em aproximadamente 20 % da contratura induzida por 100 mM de K⁺.

O estudo dos efeitos da interação do TMAO ou da sacarose com a cafeína foi realizado da seguinte maneira: inicialmente promovemos duas contraturas com solução contendo 100 mM de K⁺ e a seguir deixamos o

Tabela 1- Composição das soluções empregadas em experimentos de músculo intacto isolado de rã. Os valores estão expressos em mM exceto para os valores de osmolaridade (mosmol/kgH₂O).

Solução	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	TRIZMA	Osmolaridade
RN	110	4	2	1,8	10	224
R 100	14	100	2	1,8	10	218
RN + TMAO 50 mM	110	4	2	1,8	10	289
R 100 + TMAO 50 mM	14	100	2	1,8	10	287
RN + TMAO 100 mM	110	4	2	1,8	10	341
R 100 + TMAO 100 mM	14	100	2	1,8	10	337
RN + TMAO 200 mM	110	4	2	1,8	10	462
R 100 + TMAO 200 mM	14	100	2	1,8	10	454
RN + TMAO 300 mM	110	4	2	1,8	10	587
R100 + TMAO 300 mM	14	100	2	1,8	10	575
RN + Sacarose 50 mM	110	4	2	1,8	10	286
R 100 + Sacarose 50 mM	14	100	2	1,8	10	283
RN + Sacarose 100 mM	110	4	2	1,8	10	342
R 100 + Sacarose 100 mM	14	100	2	1,8	10	338
RN + Sacarose 200 mM	110	4	2	1,8	10	441
R 100 + Sacarose 200 mM	14	100	2	1,8	10	450
RN + Sacarose 300 mM	110	4	2	1,8	10	559
R 100 + Sacarose 300 mM	14	100	2	1,8	10	564
RN + NaCl 25 mM	110	4	2	1,8	10	259
R 100 + NaCl 25 mM	14	100	2	1,8	10	265
RN + NaCl 50 mM	110	4	2	1,8	10	377
R 100 + NaCl 50 mM	14	100	2	1,8	10	381
RN + NaCl 100 mM	110	4	2	1,8	10	496
R 100 + NaCl 100 mM	14	100	2	1,8	10	493
RN + NaCl 150 mM	110	4	2	1,8	10	654
R 100 + NaCl 150 mM	14	100	2	1,8	10	657

músculo relaxar pôr um período de 15 minutos. A seguir incubamos a preparação com cafeína (2mM) pôr 40min. Após obtermos o estado estacionário de encurtamento adicionamos a esta solução o TMAO (50mM). Em outros experimentos após a contratura cafeínica a preparação retornou para o Ringer normal e foi mantido pôr 15 minutos na ausência desta substância. Procedemos a seguir a incubação da preparação por 15 minutos com o TMAO (50mM) e então adicionamos a esta solução a cafeína (2mM). Utilizamos este último protocolo para verificar também os efeitos do aumento da tonicidade do líquido extracelular com o uso da sacarose (50mM) ou com o NaCl. Para descartamos a possibilidade de que a segunda exposição do músculo à cafeína estivesse influenciando nossos resultados, foi necessário realizar um protocolo onde verificamos esta possibilidade. Para tal realizamos duas exposições das preparações à cafeína (2mM) as quais foram intercaladas pôr um período de tempo de 40 minutos.

Foi usado também o perclorato (30mM), um ânion que potencializa fortemente o processo de acoplamento-excitação-contração de músculos esqueléticos. Para tal, realizamos duas contraturas potássicas as quais serviram como controle. Após os músculos terem relaxados em Ringer normal e mantidos nesta solução por 15 minutos, incubamos a preparação em Ringer contendo 40mM de potássio. A esta solução foi adicionado 30mM de perclorato. Em outras preparações após a exposição das mesmas a solução contendo 40mM de potássio adicionamos o TMAO (300mM) para a seguir acrescentarmos o perclorato (30mM). Em todos os casos a adição dos diferentes compostos só foi realizada após a obtenção do estado estacionário de encurtamento. Após estes procedimentos experimentais foi removido as soluções com os compostos estudados, e as preparações foram lavadas (3 vezes) e mantidas em Ringer normal até se obter um novo estado estacionário

de relaxamento. Ao final realizamos duas contraturas potássicas, com o objetivo de verificar o grau de reversibilidade do tratamento precedente.

2.3 Preparação da fibra muscular esquelética desmembranada com o uso de saponina

Após sua dissecação o músculo foi transferido para uma câmara contendo uma solução com a seguinte composição (em mM): KMSO₄ 107,85; EGTA 5,0; MgATP 2,0; BES 50,0 ; Mg²⁺ 1,0 e fosfato de creatina 15,0. Do músculo foram isoladas fibras musculares as quais foram transferidas para uma câmara contendo a mesma solução mas na presença de 30 µg de saponina, por 30 minutos. A seguir uma única fibra muscular teve as suas extremidades fixadas entre um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H., Heidelberg, República Federal da Alemanha) e mantida em posição estacionária a um braço móvel. Com o emprego de difração de raio laser, o comprimento do sarcômero foi ajustado para 2,6 µm. O registro da força de contração foi feito num polígrafo (Gold Corporation, Cleveland, modelo 2108 XX). Um conjunto de câmaras contendo diferentes soluções construídas num bloco móvel de acrílico permitiu que a fibra muscular seja submetida a diferentes protocolos experimentais (Zhu & Nosek, 1992; Nosek et al. 1990; Godt et al. 1993). Conforme determinado na tabela 2 a fibra muscular foi transferida e mantida imersa na solução R, na qual foi adicionado 2mM de cafeína, com a finalidade de promover a depleção de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Com a finalidade de realizar o carregamento de íons cálcio desta organela a fibra muscular foi transferida para uma solução contendo pCa 6,4 (solução C). Avaliou-se o tempo necessário para que o carregamento máximo de cálcio fosse obtido mediante a permanência da fibra muscular nesta solução R (com a finalidade de realizar a retirada dos íons

cálcio presentes no espaço das miofibrilas). A seguir a fibra muscular foi transferida inicialmente para a solução L a qual apresenta baixa concentração de EGTA (0,05 mM). A imersão da fibra nesta solução teve como finalidade reduzir a capacidade de tamponamento dos íons cálcio no interior das miofibrilas, o qual foi liberado do retículo sarcoplasmático. Para tal, a preparação foi transferida para a solução L, na qual foi adicionado 2mM de cafeína. Como nesta solução a capacidade de tamponamento dos íons cálcio é reduzida, isto permitiu que todo o cálcio liberado do retículo sarcoplasmático ativasse o sistema contrátil. A contração muscular assim obtida forneceu um índice apropriado da quantidade de cálcio liberada do retículo sarcoplasmático. Após a obtenção da contratura cafeínica, a preparação foi transferida para uma câmara contendo solução R. Com o objetivo de verificar o efeito do TMAO, idêntico protocolo foi realizado, acrescentando-se contudo este composto na solução L.

Para realizar o cálculo da composição das soluções empregadas nos experimentos de fibra permeabilizadas com o uso de saponina, utilizamos de um programa de computador escrito na linguagem Turbo Pascal o qual descreve as múltiplas constantes de equilíbrio de íons em solução, usando constantes de associação previamente publicadas (Godt & Lindley, 1982; Andrews et al. 1991). As tabelas 2 e 3 demonstram a composição das soluções empregadas neste estudo.

2.4 Mensuração do conteúdo hídrico do músculo sartório.

Pelo fato de não ter sido descrito na literatura o coeficiente de reflexão da membrana citoplasmática de células musculares ao TMAO, investigamos o efeito de soluções hipertônicas nas modificações de massa do músculo sartório de rã. Após a dissecação do músculo sartório, este foi mantido em Ringer

Tabela 2- Composição das soluções utilizadas nas preparações de fibras musculares esqueléticas desmembranadas com o uso de saponina. As concentrações estão expressas em mM, exceto quando indicado com *, cujo valor é expresso em mg/ml. A força iônica das soluções foi ajustada com metanosulfonato de potássio (KMSO_3). O pH das soluções (7,0) foram ajustadas com ácido metanossulfônico ou com KOH

	Solução A	Solução R	Solução C	Solução L
Mg^{2+}	1	1	1	0,1
MgATP	2	2	2	2
Fosfocreatina	15	15	15	15
EGTA	5	5	5	0,5
BES	50	50	50	50
$\text{pCa}(-\log[\text{Ca}^{2+}])$	8,5-4,0	8,5	6,4	8,5
Creatina kinase*	0,25	0,25	0,25	0,25
Força Iônica	200	200	200	200

Tabela 3- Composição da solução R (relaxante) utilizada nas preparações de fibras musculares esqueléticas desmembranadas com o uso de saponina.

pCa 8.5000

1. vol of soln	25.00	2. temp	22.00
3. ionic str	200.00	4. CP total	15.00
5. EGTA total	5.00	6. Mg++	1.00
7. MgATP	2.00	8. BES total	50.00
9. PIPES total	0.00	10. AMPT	0.00
11. ADP total	0.00	12. Pi total	0.00
13. pH	7.00		

To mix this solution you need :

Mg total (mM)	3.74120453
ATP total (mM)	2.17149617
Ca total (mM)	0.03789893
KMS (mM)	107.85628685
ADP free (mM)	0.00000000
Pi free (mM)	0.00000000
AMP free (mM)	0.00000000
KOH (mM)	0.87785630
MS (mM)	115.41449377

ionic strength (mM) 199.99984620

Ca++	3.1622776601684E-009	K+	1.7492704795535E-001
Ktotal	1.7500904151995E-001	ATP-4	5.8591256719868E-005
HATP-3	2.6690004376883E-005	H2ATP-2	4.0453175725891E-008
KATP-3	8.1993564592006E-005	CaATP-2	1.7994663342904E-009
CaHATP-	1.2926665126760E-011	MgHATP-	4.1790749468661E-006
EGTA-4	1.3542994797038E-007	HEGTA-3	5.5044921492522E-005
H2EGTA-2	4.7465410330489E-003	H3EGTA-	2.8289384556971E-007
H4EGTA	3.7719179409295E-012	CaEGTA-2	3.7858499910593E-005
CaHEGTA-	3.4813465108305E-008	MgEGTA-2	2.1939651571201E-005
MgHEGTA-	1.3816275294623E-004	CP-2	1.4423076309099E-002
CaCP	6.3853680804436E-010	MgCP	5.7692305236397E-004
MgADP-	0.0000000000000E+000	MgHADP	0.0000000000000E+000
HADP-2	0.0000000000000E+000	H2ADP-	0.0000000000000E+000
MgHP	0.0000000000000E+000	HP-2	0.0000000000000E+000
H2P-	0.0000000000000E+000	CaADP-	0.0000000000000E+000
MgH2P+	0.0000000000000E+000	CaHP	0.0000000000000E+000
CaH2P+	0.0000000000000E+000	CaHADP	0.0000000000000E+000
KADP-2	0.0000000000000E+000	KHP-	0.0000000000000E+000
HAMP-	0.0000000000000E+000	H2AMP	0.0000000000000E+000
MgAMP	0.0000000000000E+000	CaAMP	0.0000000000000E+000
KAMP	0.0000000000000E+000	KAMP	0.0000000000000E+000
BES-	1.8184464085094E-002	HBES	3.1815535914906E-002
MgBES+	0.0000000000000E+000	CaBES+	0.0000000000000E+000

Stock solution (ml) needed to mix 25 ml

KMS	5.393 ml	of 0.5000 M soln
EGTA	1.250 ml	of 0.1000 M soln
CaCl2	0.009 ml	of 0.1000 M soln
MgCl2	0.935 ml	of 0.1000 M soln
ATP	0.543 ml	of 0.1000 M soln
CP	3.750 ml	of 0.1000 M soln
ADP	0.000 ml	of 0.1000 M soln
Pi	0.000 ml	of 0.1000 M soln
AMP	0.000 ml	of 0.1000 M soln
BES-7.0	3.125 ml	of 0.4000 M soln
KOH	0.022 ml	of 1.0000 M soln
H2O	9.973 ml	

normal e a seguir transferido para uma placa de vidro côncava para se fazer a mensuração inicial do mesmo empregando-se uma balança analítica (resolução de 1 mg). Após mergulharmos o músculo nas soluções contendo 300 mM de TMAO, sacarose ou uréia, pelo tempo de 3, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos realizamos a mensuração do peso aos mesmos. Foi também mensurado as variações de massa das preparação após o retorno das mesmas ao Ringer normal em tempos idênticos aos anteriormente descritos. Os dados estão normalizados em valores percentuais àqueles obtidos em Ringer normal no início do experimento.

3. RESULTADOS

3.1 Alterações da massa muscular induzida por TMAO, sacarose ou ureia

Como relatado anteriormente não foi encontrado na literatura o coeficiente de reflexão da membrana citoplasmática das células musculares, foi investigado o efeito do TMAO, sacarose ou uréia nas modificações de massa do músculo sartório de rã. Na tabela 4 estão os dados da variação de massa muscular no tempo em diferentes condições experimentais.

Comparando-se os valores de massa muscular no tempo de preparações submetidas à soluções contendo TMAO ou sacarose verificamos que estes valores não diferiram significativamente. Isto sugere que a membrana citoplasmática do músculo sartório da rã apresenta idênticos valores de coeficiente de reflexão para estes solutos. Por outro lado os valores de massa muscular obtidos na presença de soluções extracelulares contendo 300 mM de uréia diferem dos obtidos com TMAO ou sacarose (figura 4).

3.2 Efeitos das várias concentrações de TMAO, betaina, sacarose ou NaCl no músculo esquelético

A figura 5B, mostra os efeitos de concentrações crescentes (50 a 300 mM) do TMAO, betaína, NaCl ou sacarose na contratura induzida por 100 mM de potássio. Como pode ser observado o incremento na concentração extracelular de NaCl ou Betaína, promoveu redução no encurtamento muscular. Por outro lado, a presença de TMAO ou sacarose potencializou a contratura potássica. Para uma dada concentração de osmólito, o grau de

Tabela 4- Variações da massa de músculo sartório de rã na presença de TMAO, sacarose ou uréia. Os valores de massa muscular estão expressos em valores absolutos e também normalizados para valores percentuais obtidos na ausência dos respectivos osmólitos.

TEMPO (min)	TMAO	SACAROSE	URÉIA
Inicial	0,823g	0,815	1,006
3	0,789g (95,87 %)	0,795 (97,55 %)	1,051 (104,47 %)
6	0,752g (91,38 %)	0,774 (94,96 %)	1,058 (105,22 %)
10	0,741g (90,04 %)	0,748 (91,78 %)	1,070 (106,36 %)
20	0,719g (87,36 %)	0,724 (88,83 %)	1,045 (103,88 %)
30	0,715g (86,88 %)	0,713 (87,48 %)	1,052 (104,57 %)
40	0,691g (83,96 %)	0,706 (86,63 %)	1,029 (102,29 %)
50	0,684g (83,11 %)	0,702 (86,13 %)	1,019 (101,34 %)
60	0,682g (82,87 %)	0,694 (85,15 %)	1,014 (100,93 %)
	Ringer normal	Ringer normal	Ringer normal
3	0,707g (85,90 %)	0,709 (86,99 %)	1,043 (103,73 %)
6	0,726g (88,21 %)	0,721 (88,47 %)	1,042 (103,63 %)
10	0,731g (88,82 %)	0,735 (90,18 %)	1,056 (104,97 %)
20	0,746g (90,87 %)	0,737 (90,43 %)	1,091 (108,45 %)
30	0,755g (91,38 %)	0,755 (92,64 %)	1,092 (108,55 %)
40	0,766g (93,07 %)	0,766 (93,99 %)	1,128 (112,18 %)
50	0,791g (96,11 %)	0,770 (94,48 %)	1,139 (113,22 %)
60	0,805g (97,81 %)	0,781 (95,83 %)	1,159 (115,26 %)
70	0,808g (98,18 %)	0,805 (98,77 %)	1,149 (114,22 %)

Figura 4 – Curso temporal das variações da massa do músculo sartório de rã quando colocado em solução contendo 300 mM de TMAO, sacarose ou uréia. Os músculos permaneceram em solução contendo estes osmólitos durante os primeiros 60 minutos, e após este tempo eles retornaram ao Ringer normal conforme indicado pela linha vertical tracejada. Os pontos correspondem os valores de massa muscular expressos em valores percentuais dos obtidos no tempo zero (Ringer normal) e mensurados nos tempos correspondentes.

Efeitos do TMAO, sacarose ou uréia na massa do músculo sartório isolado de rã.

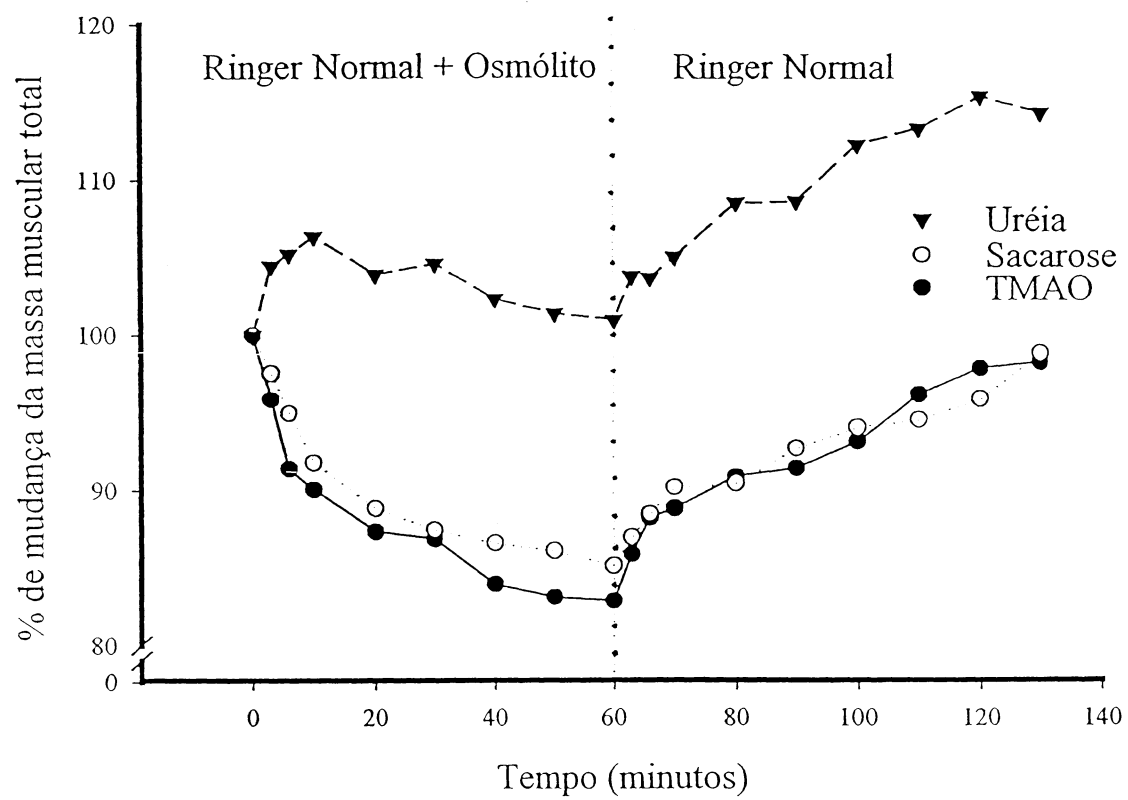
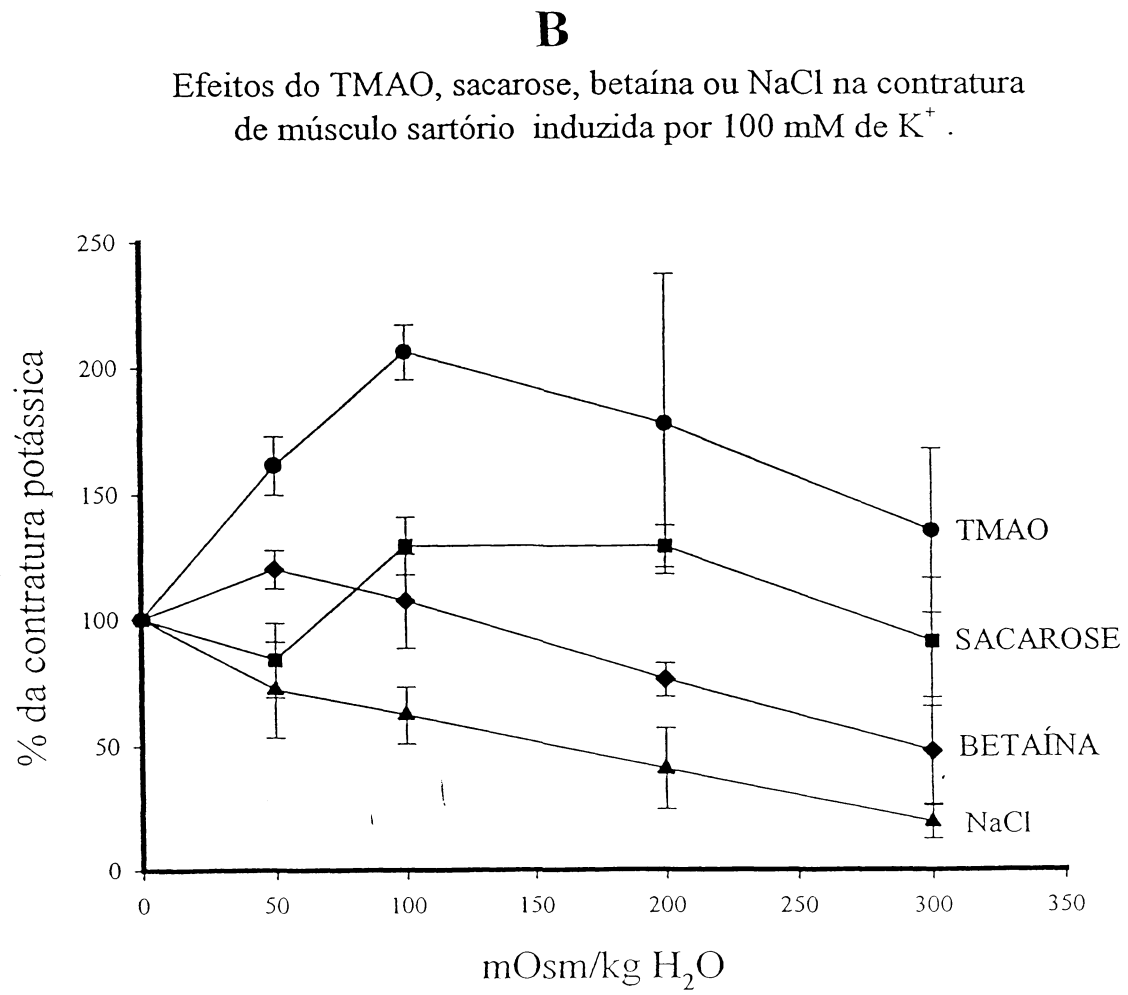
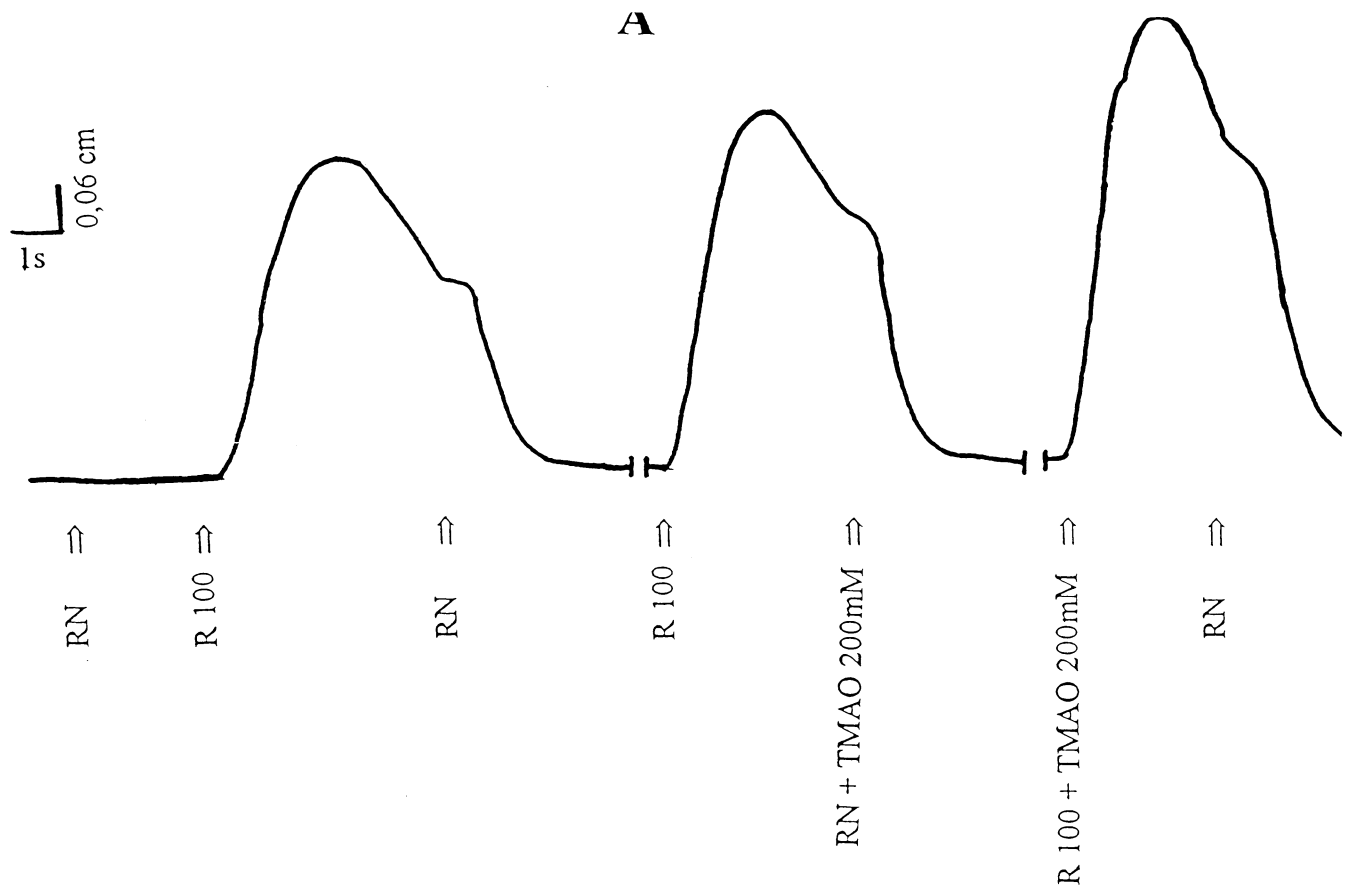


Figura 5 A- Registro original de um experimento típico mostrando a potencialização da contratura potássica, quando o músculo foi incubado previamente com TMAO. Após cada contratura potássica a preparação foi mantida em Ringer normal, durante 15 minutos. O TMAO (200 mM) foi adicionado em Ringer normal após a segunda contratura potássica e foi mantido por 15 minutos. Após este intervalo de tempo, substituímos a solução incubadora por uma contendo Ringer 100 mM de potássio no qual adicionou-se TMAO (200 mM). Nota-se que a presença de TMAO produziu potencialização da contratura potássica. Idêntico protocolo foi empregado em experimentos realizado com outros osmólitos e em diferentes concentrações.

B- Efeitos de soluções com diferentes tonicidades ajustadas com TMAO, sacarose, betaina ou NaCl no encurtamento de músculo sartório de rã induzido por 100 mM de potássio. Os dados de encurtamento muscular estão normalizados (em valores percentuais) para àqueles obtidos com Ringer contendo 100 mM de potássio e na ausência de osmólitos. Os valores estão expressos como a média \pm o erro padrão de no mínimo 6 experimentos.



potencialização da contratura potássica foi maior na presença de óxido de trimetilamina. Na presença de 200 mM de TMAO obtivemos grande variabilidade de resultados. Os valores de encurtamento muscular em relação ao controle oscilaram de 72,72 a 470,58 %. A inibição da contratura potássica promovida por 300 mM de NaCl tiveram um caráter irreversível, conforme demonstrado na figura 6. Diferentemente na presença de 300 mM de TMAO, as contraturas potássicas foram reproduzíveis em todas as preparações testadas e em pelo menos 2 contraturas potássicas posteriores a exposição das mesmas a esta concentração de TMAO.

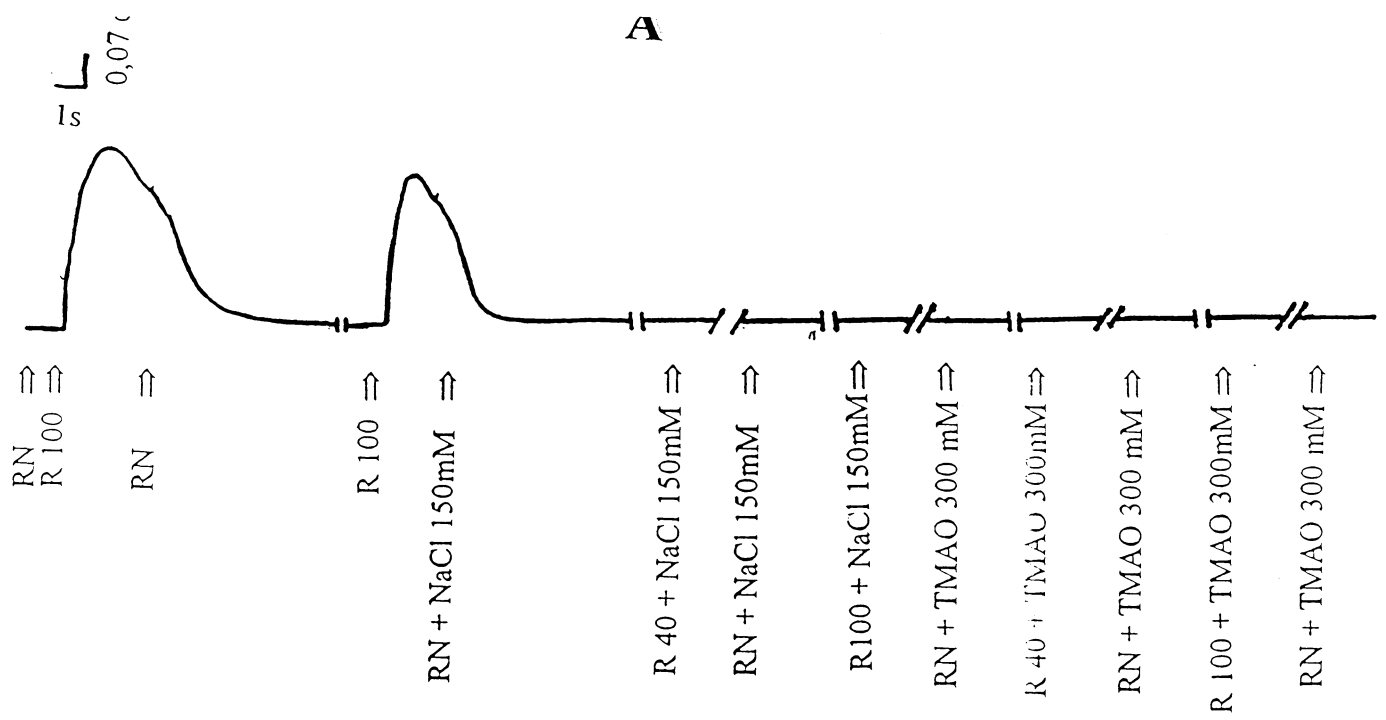
3.3 Efeitos do TMAO conjuntamente com o perclorato

Os resultados dos efeitos do íon perclorato e sua interação com o óxido de trimetil-amina estão representados na figura 7. Verifica-se que o perclorato quando adicionado a uma solução de Ringer contendo 40 mM de potássio, potencializa a contratura potássica em aproximadamente 330 % conforme demonstrado na figura 7. As contrações induzidas por perclorato foram parcialmente irreversíveis conforme demonstrado na figura 8A. Este caráter irreversível foi observado em todos os experimentos realizados, mesmo em preparações mantidas em Ringer normal por um período de tempo superior a 45 minutos.

Para avaliarmos o efeito do TMAO conjuntamente com o perclorato, realizamos experimentos empregando-se protocolos semelhantes aos descritos anteriormente. Para tal, incubamos as preparações com 300 mM de TMAO antes de adicionarmos o perclorato. Como demonstrado na figura 7 o perclorato quando adicionado à solução contendo 40 mM de potássio e 300 mM de TMAO potencializou a contratura potássica (40 mM de potássio) em

Figura 6 A- Registro original de um experimento típico mostrando os efeitos da exposição do músculo sartório de rã, à solução de Ringer contendo NaCl (150 mM) ou TMAO (300 mM) na contratura induzida por 40 mM e 100mM de potássio. Com exceção do intervalo de tempo entre as duas primeiras contraturas potássicas no qual a preparação foi mantida em Ringer normal, a preparação foi mantida em Ringer hipertônico com 150 mM de NaCl. O óxido de trimetil amina foi adicionado 15 minutos antes de procedermos o incremento na concentração de potássio. As quebras da linha transversal e vertical do registro original representam respectivamente o tempo de 3 e 15 minutos, tempo esse em que o quimógrafo permaneceu desligado.

B- Representação gráfica dos dados de encurtamento de músculo sartório de rã induzido por solução de Ringer contendo 40 ou 100 mM de potássio na ausência e na presença de 300 mM de TMAO ou de 150 mM de NaCl. As contrações com NaCl ou TMAO são inibidas em aproximadamente 90 % das contrações potássicas controle.



B

Efeitos do NaCl (150 mM) ou do TMAO (300 mM) na contratura potássica de músculo sartório de rã.

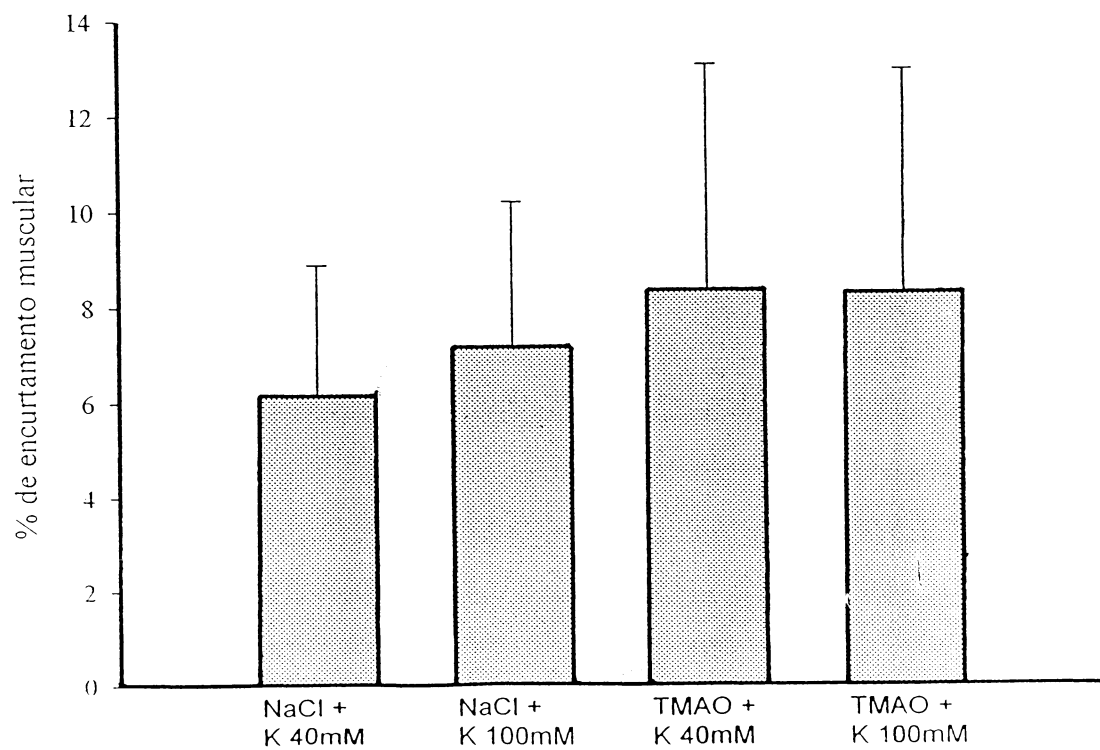


Figura 7 – Representação gráfica dos dados de encurtamento de músculo sartório de rã induzido pelo íon perclorato em solução de Ringer contendo 40 mM de potássio na ausência e na presença de TMAO (300 mM). Os dados estão normalizados e expressos em valores percentuais àqueles obtidos em Ringer 100 mM de potássio e representam como a média \pm erro padrão.

Efeitos do ion perclorato (30mM) na presença e na ausência de TMAO (300mM), na contratura potassica.

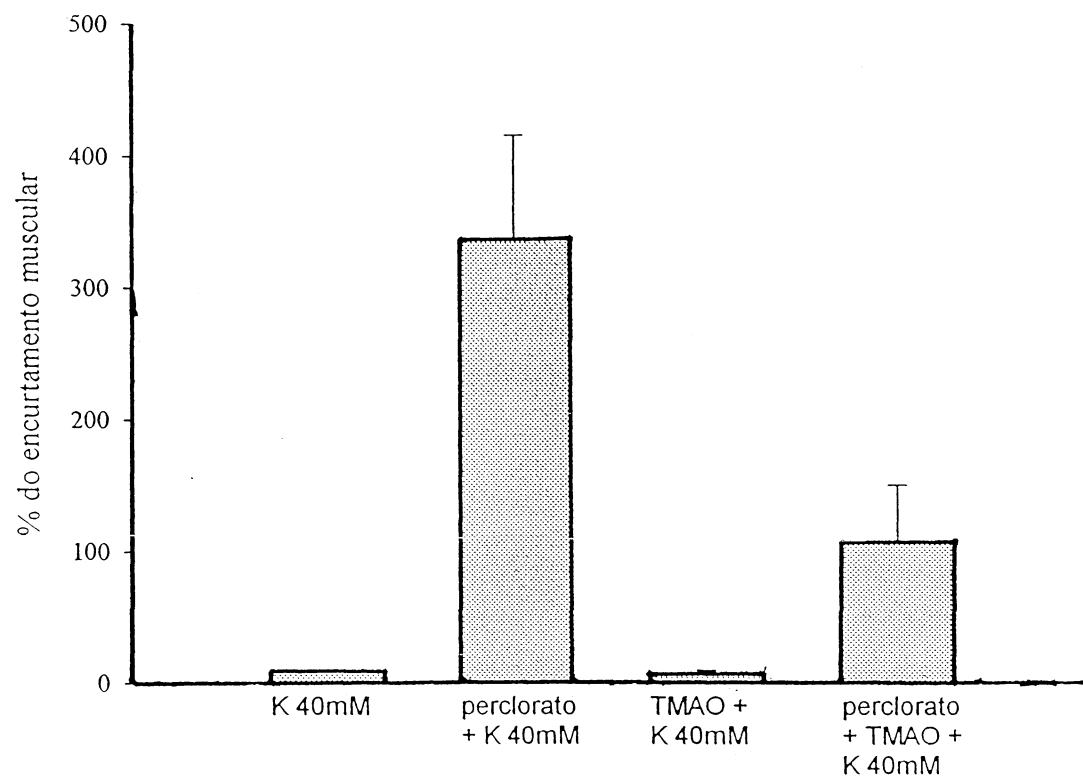
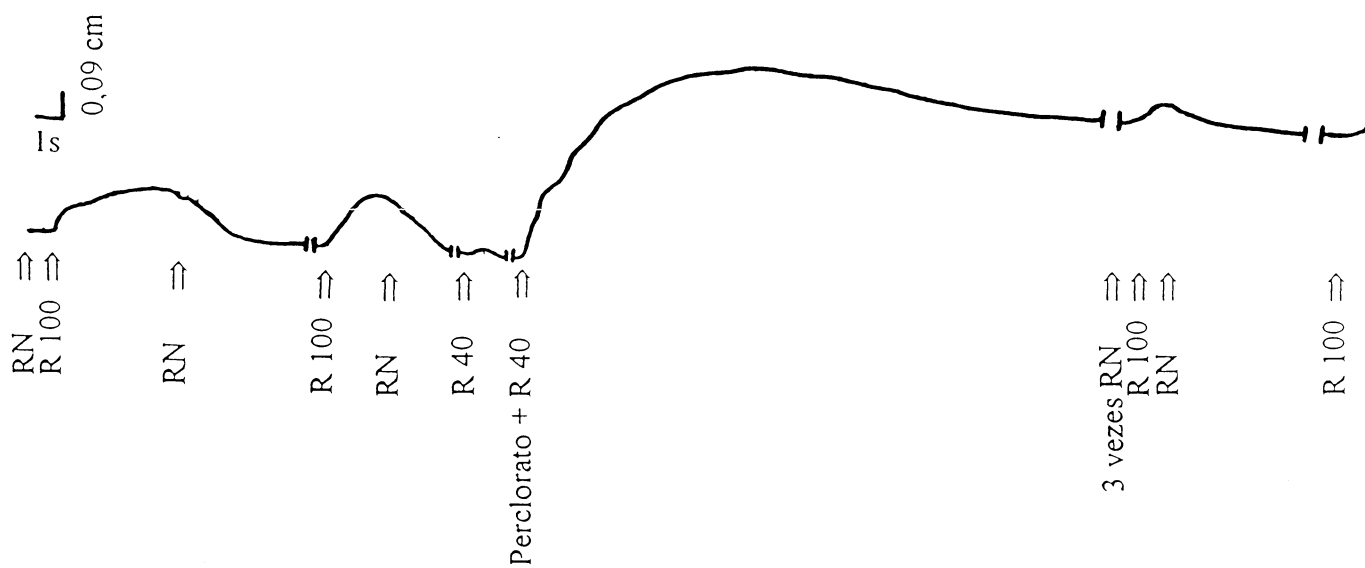
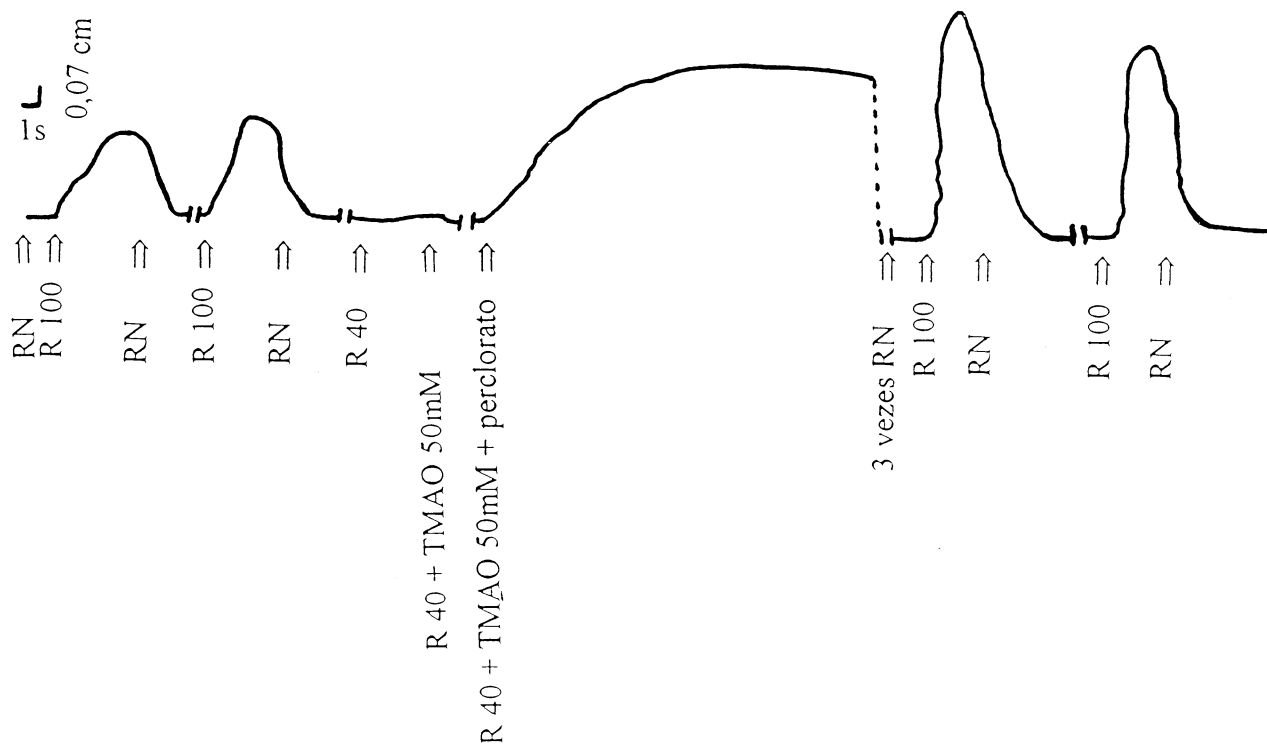


Figura 8 - Registro original de um experimento típico demonstrando o efeito do íon perclorato na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 50 mM de TMAO no encurtamento de músculo sartório de rã. O íon perclorato ou o TMAO foram adicionados na solução contendo 40 mM de potássio. Observar que após a exposição da preparação ao TMAO, o músculo relaxou totalmente e as contraturas subsequentes com 100 mM de potássio foram potencializadas. As quebras da linha do registro original representam o tempo de pelo menos 15 minutos, tempo esse em que o quimógrafo permaneceu desligado.

A



B



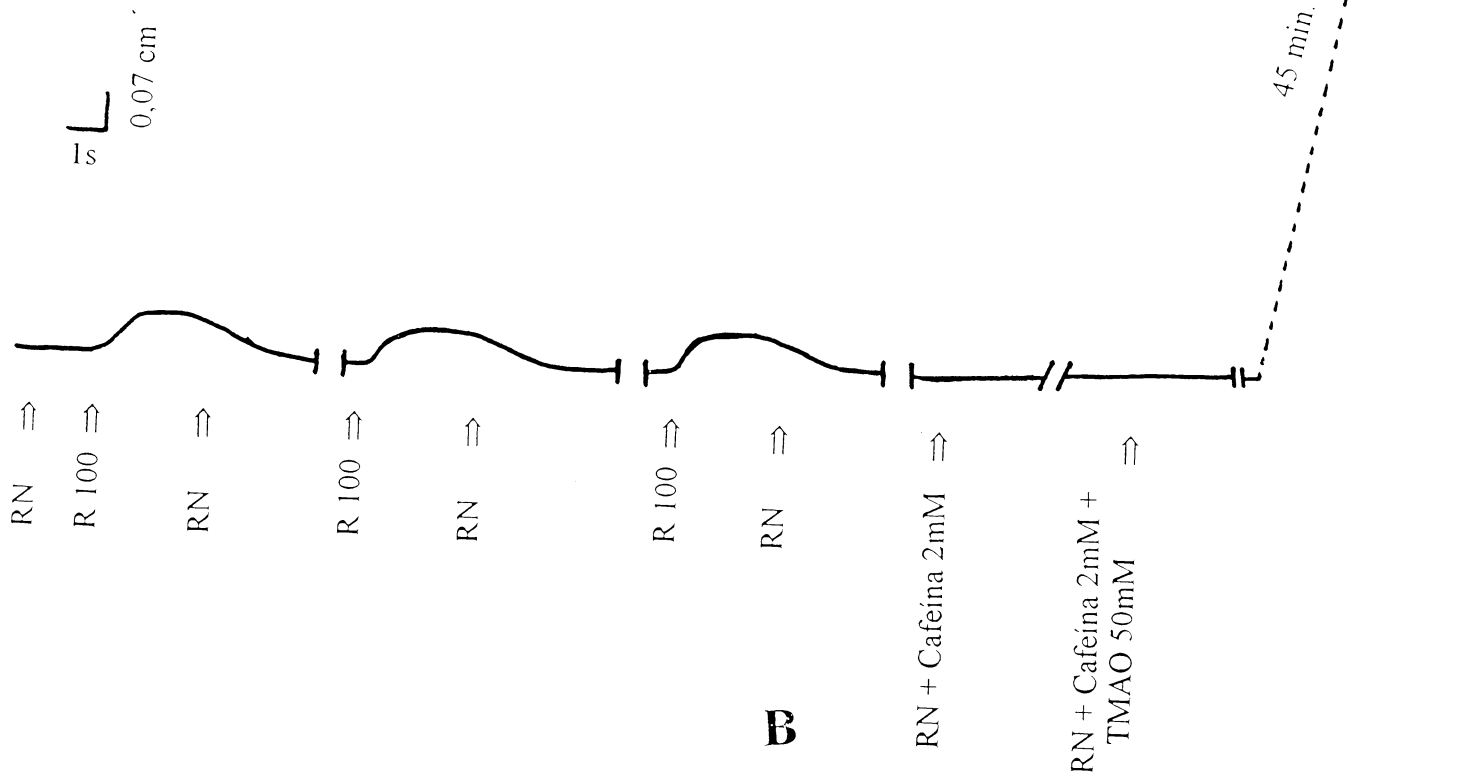
aproximadamente 5 vezes. Como pode ser visualizado na figura 8B, após o retorno da preparação ao Ringer normal, a mesma relaxou totalmente e duas contraturas potássicas (100 mM) foram realizadas. Salienta-se aqui que estas contraturas foram potencializadas em aproximadamente 175 % das contraturas controle iniciais. Tal relaxamento não foi observado quando o músculo foi exposto somente ao íon perclorato (figura 8A).

3.4 Efeitos da hipertonicidade na contratura cafeínica

Os efeitos do aumento da tonicidade do líquido extracelular obtido pelo emprego de NaCl, sacarose ou TMAO estão demonstrados nas figuras 9, 10, 11 e 12. Empregando-se 2 mM de cafeína obtivemos aproximadamente 10 % da contratura potássica (100 mM). Nestas condições experimentais as contraturas cafeínicas foram totalmente reversíveis. O aumento da tonicidade com 50 mM de sucrose, TMAO, sacarose ou NaCl, não promoveu alteração nos níveis de comprimento muscular. A adição de cafeína à solução nutritora contendo TMAO, sacarose ou NaCl promoveu encurtamentos musculares os quais foram respectivamente de 1200%, 400% e 80% aproximadamente dos valores da contratura potássica. Estes dados demonstram que a potencialização da contratura cafeínica não pode ser atribuída ao simples aumento da tonicidade do líquido extracelular. A potencialização da contratura cafeínica poderia ser consequência da segunda exposição das preparações a este composto. Para tal realizamos experimentos nos quais, manteve-se idêntico intervalo de tempo entre duas exposições à cafeína na ausência de osmólitos. Verificamos que os valores de encurtamento muscular obtidos pela segunda exposição a cafeína não diferiram significativamente.

Figura 9 A- Registro original de um experimento típico demonstrando os efeitos do TMAO (50 mM) na presença de cafeína (2mM) no encurtamento do músculo sartório de rã. Após ter-se obtido o estado estacionário de encurtamento muscular na presença de cafeína o TMAO foi adicionado diretamente na solução nutritora. As quebras da linha verticais e transversais representam respectivamente 15 e 40 minutos, tempo esse em que o quimógrafo permaneceu desligado.

B- Representação gráfica dos dados de encurtamento muscular de preparações de músculo sartório isolado e intacto de rã: Efeitos da cafeína (2 mM) na ausência e na presença de TMAO (50 mM). Os dados de encurtamento muscular estão normalizados e expressos em valores percentuais àqueles obtidos em Ringer 100 mM de potássio e representam a media \pm erro padrão.

A**B**

Efeitos da interação do TMAO (50mM) e da cafeína (2mM) no encurtamento muscular.

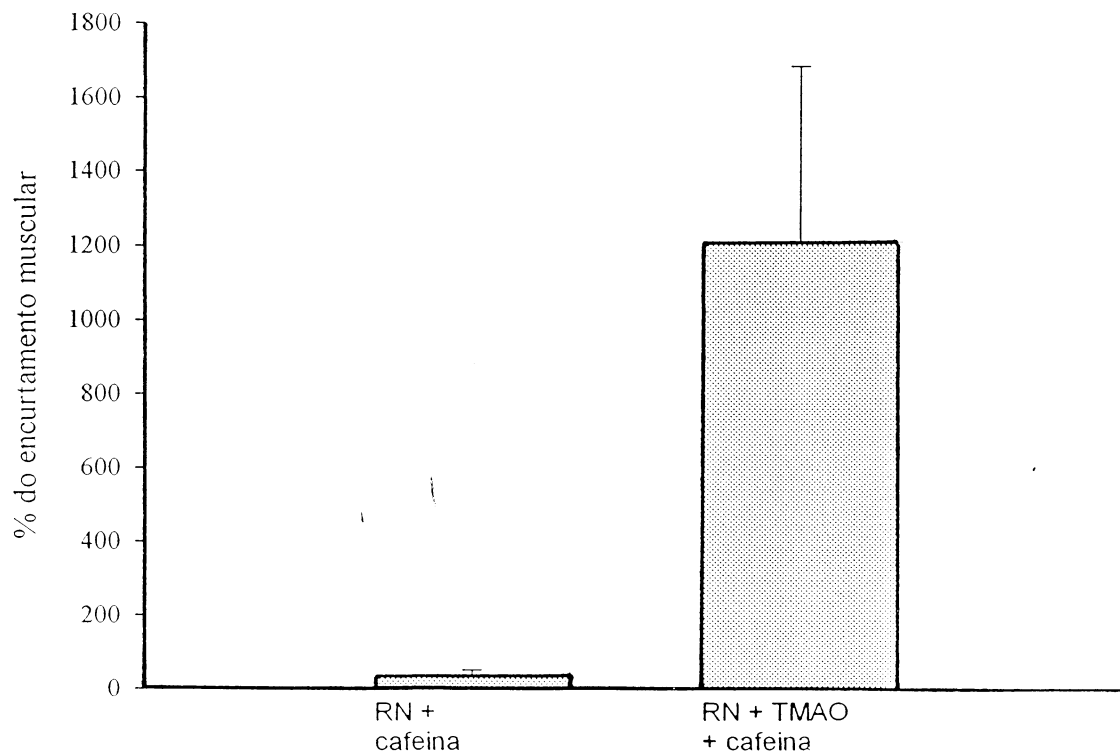
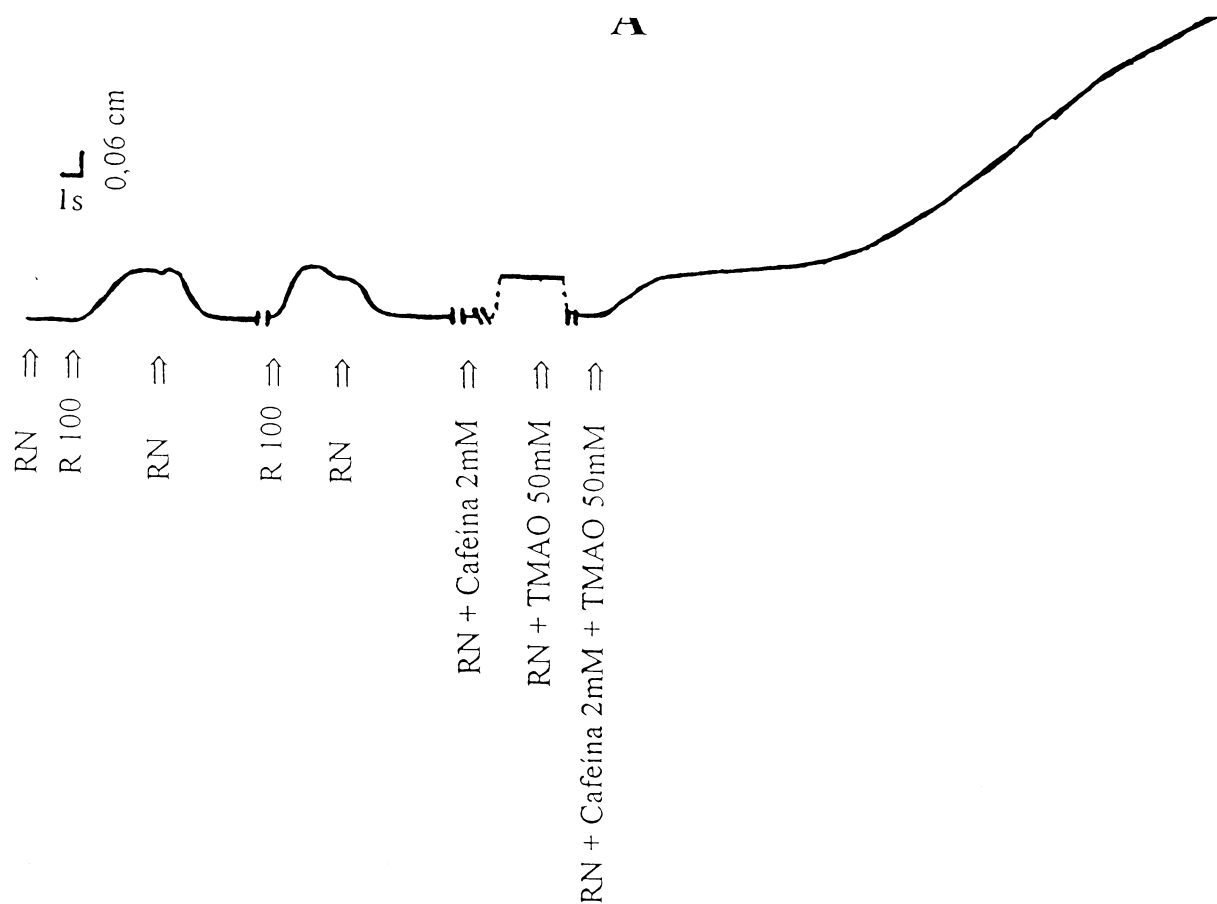


Figura 10 A- Registro original das variações de encurtamento muscular no tempo, em um experimento típico obtido de uma preparação exposta ao TMAO (50 mM), na ausência e na presença de cafeína (2 mM). Após a obtenção do estado estacionário de encurtamento muscular na presença de cafeína, substituiu-se e manteve-se a preparação por 40 minutos em solução contendo 50 mM de TMAO em Ringer normal. Subsequentemente a cafeína foi adicionada diretamente a essa solução. As quebras da linha verticais e transversais representam respectivamente o intervalo de tempo de 15 e 40 minutos, tempo esse em que o quimógrafo permaneceu desligado.

B- Efeitos da interação do TMAO (50 mM) e da cafeína (2 mM) no encurtamento de músculo sartório isolado de rã. Os dados de encurtamento muscular estão normalizados e expressos em valores percentuais àqueles obtidos em Ringer 100 mM de potássio e representam a media \pm erro padrão.



B

Efeitos da interação do TMAO (50mM) e da cafeína (2mM) no encurtamento muscular.

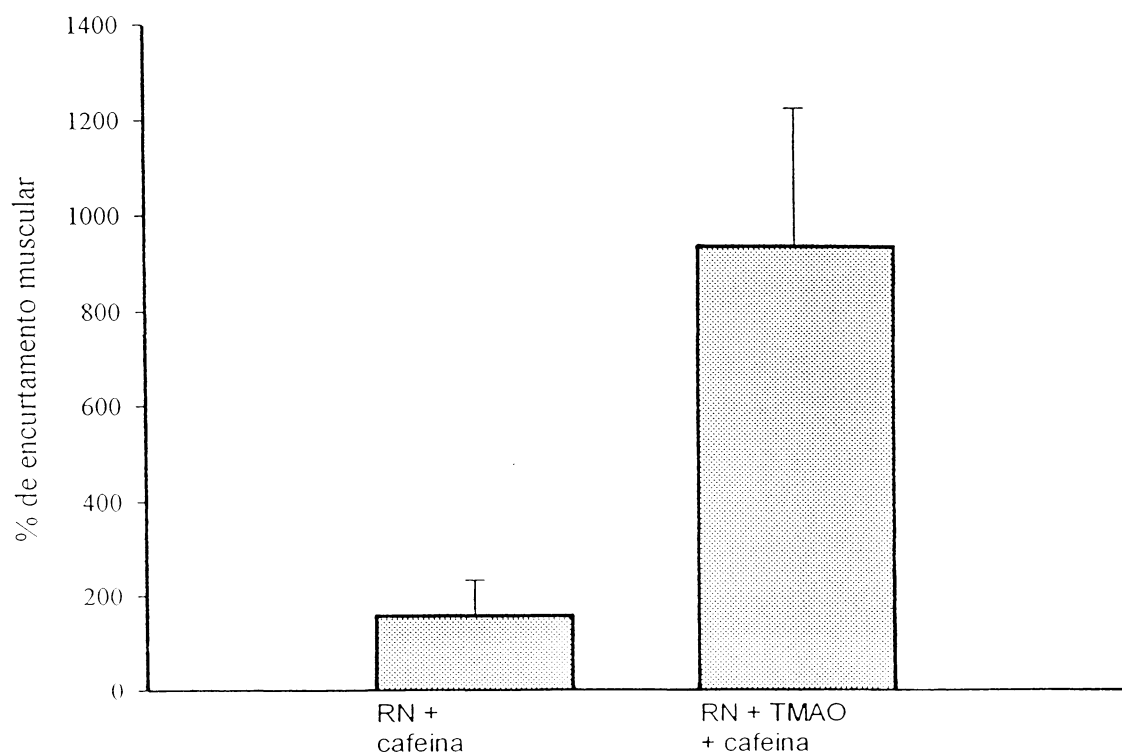
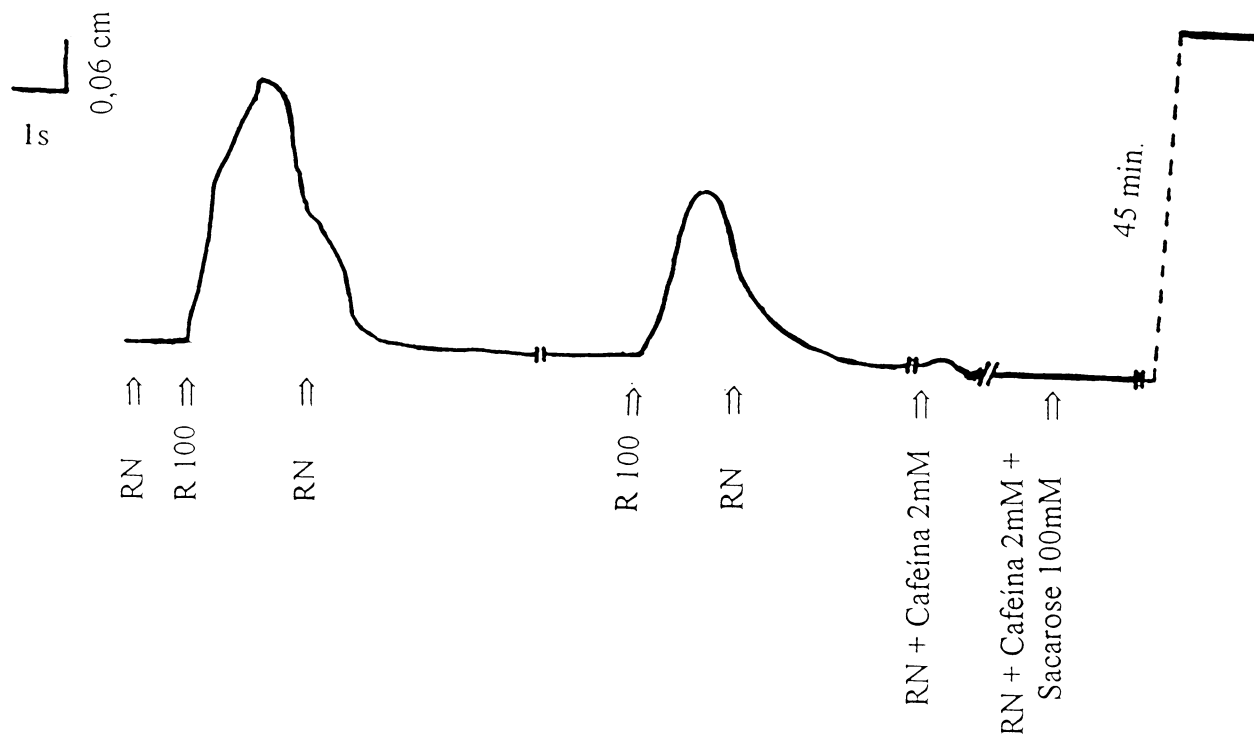


Figura 11 A- Registro original das variações de comprimento muscular obtido em um experimento típico: Efeitos da cafeína na ausência e na presença de sacarose (100 mM). Após duas contraturas potássicas a preparação foi exposta à cafeína (2 mM). A seguir aumentou-se a tonicidade da solução pela adição direta de sacarose (100 mM). As quebras da linha vertical e transversal representam o intervalo de tempo de 15 e 40 minutos respectivamente, tempo esse em que o quimógrafo permaneceu desligado.

B- Representação gráfica dos resultados obtidos de encurtamento muscular de músculo sartório de rã, conforme protocolo descrito em A. Os dados de encurtamento muscular estão normalizados e expressos em valores percentuais àqueles obtidos em Ringer 100 mM de potássio e representam a média \pm erro padrão.

A**B**

Efeitos da interação da sacarose (50 mM) e da cafeína (2 mM)
no encurtamento muscular.

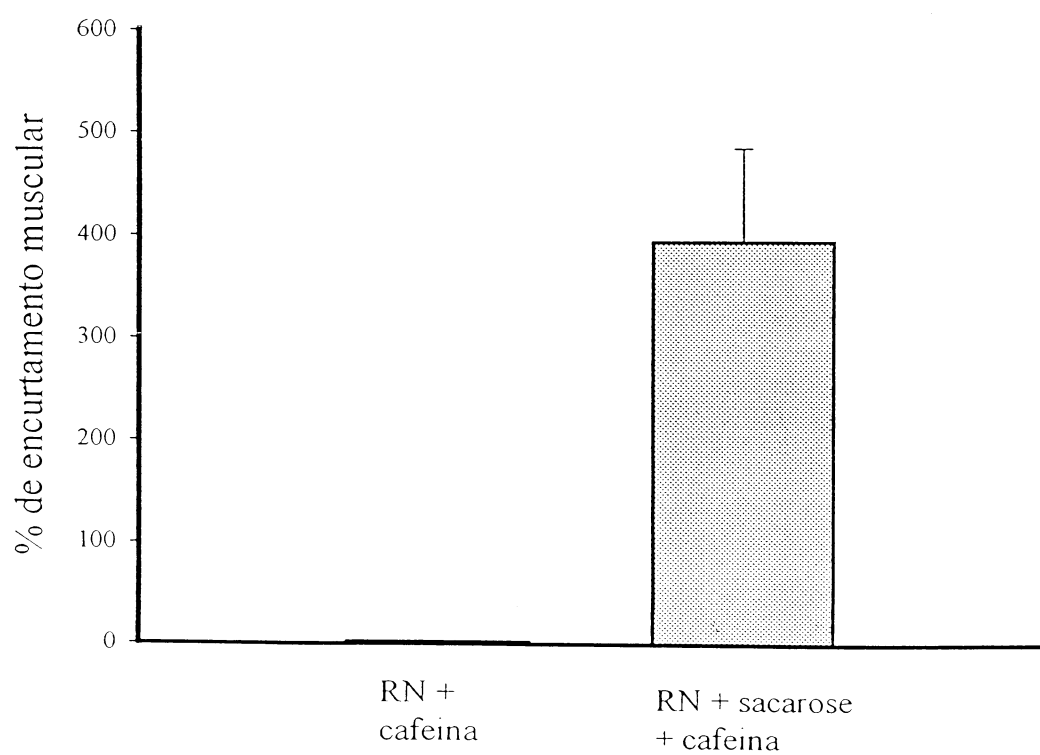
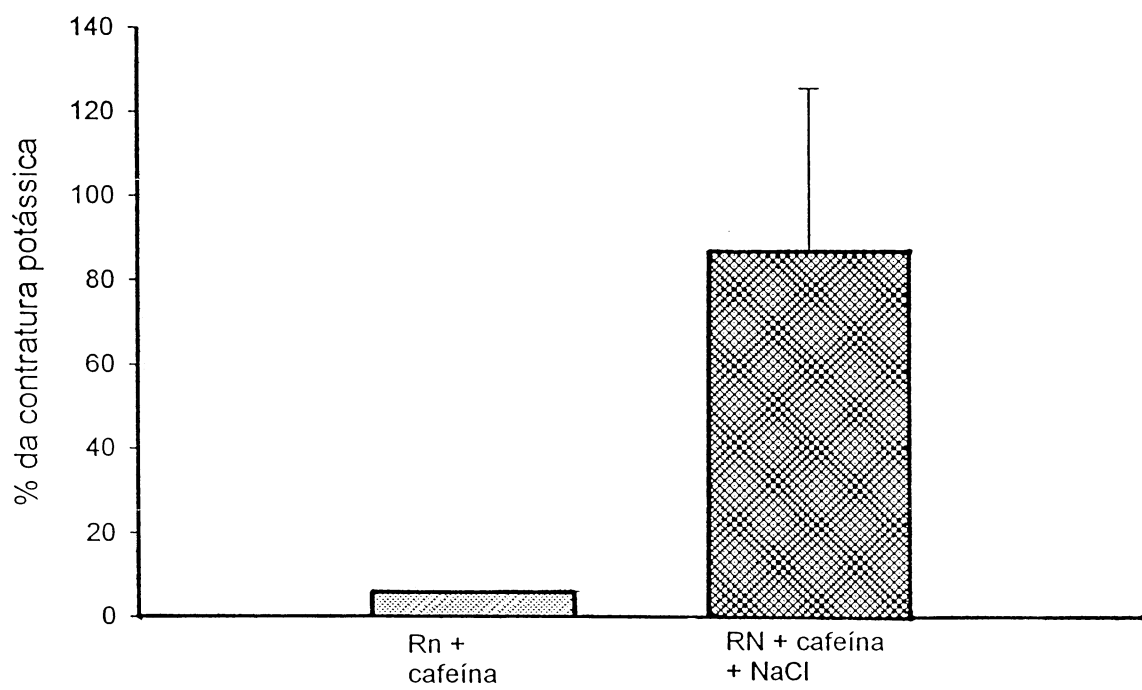


Figura 12- Representação gráfica dos dados de encurtamento muscular obtidos em experimentos de músculo sartório isolado de rã, submetidos à soluções hipertônicas ajustadas com NaCl (50 mM) na ausência e na presença de cafeína (2 mM). Os dados de encurtamento muscular estão normalizados e expressos em valores percentuais àqueles obtidos em Ringer 100 mM de potássio e representam a média \pm erro padrão.

Efeitos da interação do NaCl (50 mM) e da cafeína (2mM) no encurtamento muscular.

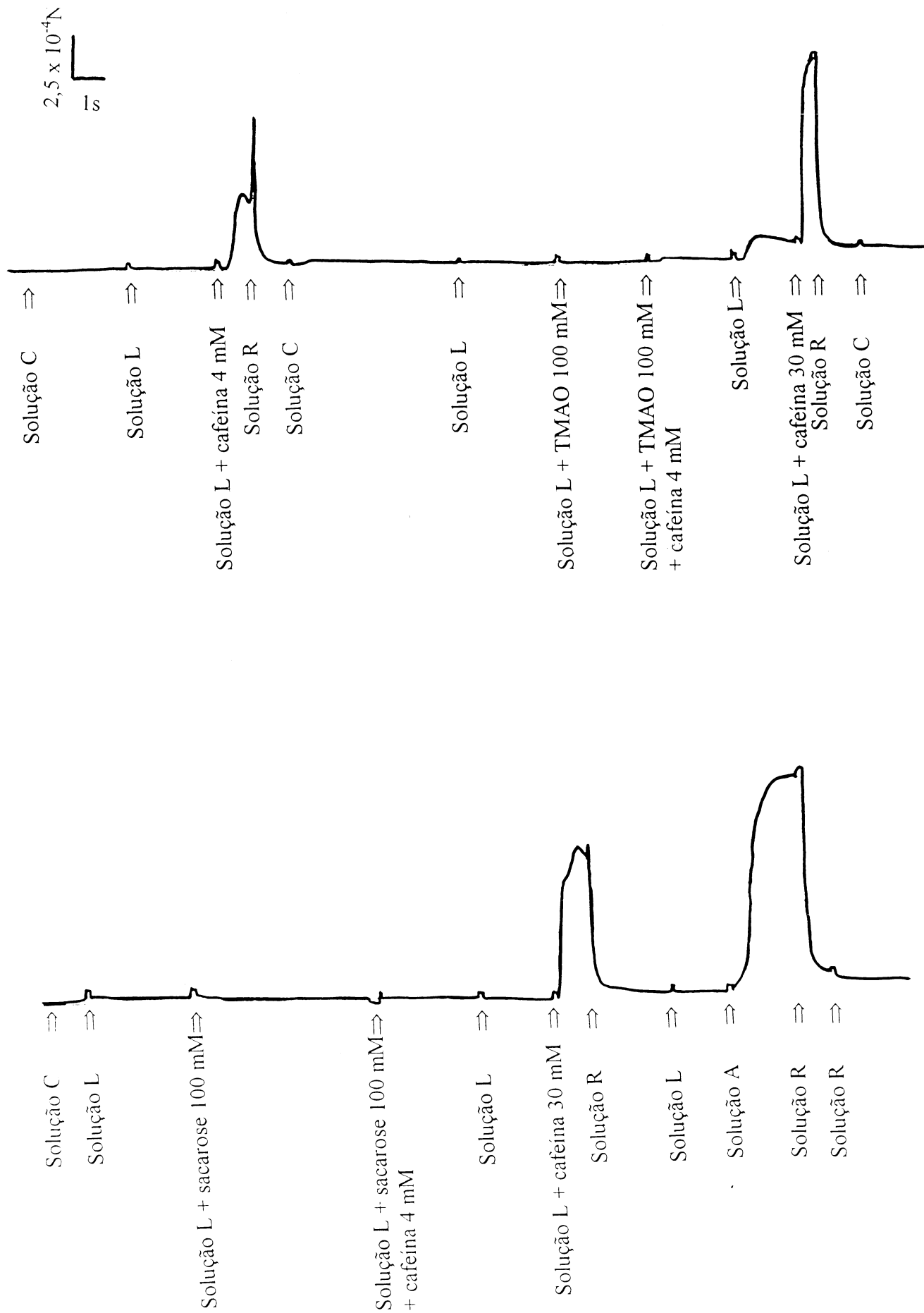


Outra série de experimentos foram realizados com o objetivo de se verificar a interação do óxido de trimetilamina em preparações previamente expostas a cafeína. Um registro original de um experimento típico está demonstrado na figura 10A e os resultados experimentais estão representados na figura 10B. Como pode ser visualizado, após a obtenção do estado estacionário da contratura cafeínica, a presença do TMAO na solução nutritora potencializou grandemente estas contraturas.

3.6 Efeitos da interação da cafeína com o TMAO na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático de fibra isolada e permeabilizada com saponina

Em preparações de células musculares esqueléticas permeabilizadas com o uso de saponina permite se investigar os mecanismos envolvidos na captação e liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. A figura 13 é um registro original de um experimento típico. Verifica-se que nestas preparações, após o carregamento do retículo sarcoplasmático com íons cálcio a exposição à cafeína promoveu contração muscular a qual atingiu aproximadamente 80 % ao da contração muscular obtida pela ativação do sistema contrátil em solução pCa 4,0. Em preparações expostas a 4 mM de cafeína a produção de força atingiu aproximadamente 30 da resposta contrátil obtida com 30 mM de cafeína. A exposição das preparações a sucrose (100 mM) ou ao TMAO (100 mM) isoladamente ou em combinação com a cafeína (4 mM) não promoveram incremento da força de contração em 5 preparações testadas.

Figura 13- Registro original de um experimento de fibra muscular isolada de rã, demonstrando os efeitos da cafeína (4 mM) isoladamente e em combinação com a sacarose (100 mM) ou TMAO (100 mM) na produção de força.



4- DISCUSSÃO

O aumento ou diminuição do volume de líquido intracelular e extracelular são em última instância, decorrentes de alterações da osmolaridade destes compartimentos visto que, com poucas exceções, as membranas celulares são totalmente permeáveis ao solvente, no caso a água. Assim, mesmo dispondo de um sistema complexo e eficiente de regulação da osmolaridade e da composição química do líquido extracelular, o volume do líquido intracelular é também mantido dentro de estreita faixa fisiológica, graças a existência de sistemas de transportes de osmólitos presentes na membrana celular de todas as células. Tal constância da composição química e do volume do “meio interno” tem como finalidade primordial manter íntegra as funções celulares que em última instância dependem da adequada organização estrutural e bioquímica de todas as células. Isto porque, alterações (não mutualmente exclusivas) destes dois parâmetros induzem amplas repercussões na fisiologia celular.

Muitos são os estudos que visam correlacionar as alterações do volume de líquido intracelular com funções celulares (Lang, Busch, Ritter, Völkl, Waldegger, Gulbins & Häussinger, 1998; Burg, 1995). Tais estudos tem fornecidos importantes subsídios para a compreensão da relação indissociável de estruturas celulares com as respectivas funções pôr estas desenvolvidas.

Alterações da tonicidade do líquido extracelular provocam em células musculares estriadas, profundas modificações na sua capacidade de desenvolvimento de força (Caputo, 1968; Gordon & Godt, 1970; Homsher, Bruggs and Wise, 1974; Mansson, 1989; Godt, Fogaça, Andréws and Nosek, 1993). Apesar da redução na produção de força observada quando células musculares estriadas são submetidas a soluções hipertônicas, a excitabilidade

da membrana das mesma é mantida. Tem sido demonstrado que o aumento na tonicidade do líquido extracelular (por incremento na concentração de NaCl, de sacarose ou de outros compostos impermeáveis ao sarcolema), reduzem a produção de força (Gordon & Godt, 1970; Suarez-Kurtz & Sorenson, 1977; Vaughan, Dusik and Trotter, 1982; Lamb, Stephenson & Stienen, 1992) induzida por despolarização do sarcolema com KCl. Contudo, outros autores demonstraram, em condições experimentais semelhantes, um incremento (Caputo, 1968; Kita, Narita and Van Der Kloot, 1982; Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993). Nos estudos onde se obtiveram redução na produção de força, os autores atribuíram tais efeitos, a alterações no processo de acoplamento-excitação contração e/ou de alterações na capacidade de desenvolvimento de força pelo sistema contrátil como uma consequência secundária do aumento da força iônica do líquido intracelular (Gordon & Godt, 1970; Homsher, 1974; Godt, Kirby and Gordon, 1984; Lamb, Stephenson and Stienen, 1992). Alterações no processo de acoplamento excitação-contração de células musculares de anfíbio poderiam explicar a redução de força obtida por despolarização com KCl ou por estimulação elétrica, visto que nestas preparações a contratura muscular induzida por cafeína foi mantida inalterada (Gordon & Godt, 1970; Lännergren & Noth, 1973; Godt, Kirby and Gordon, 1984). Contudo outros trabalhos demonstram que tal redução de força seria decorrente de alterações da capacidade de produção de força pelo sistema contrátil de células tônicas, a qual seria consequência do incremento da força iônica do meio intracelular (Gordon & Godt, 1970; Mansson, 1989), conforme demonstrado em experimentos com fibra musculares que tiveram suas membranas celulares mecanicamente removidas e nas quais se procedeu a ativação do sistema contrátil com íons cálcio (Gordon & Godt, 1970). Apesar de existirem vários relatos na literatura

de que o aumento da tonicidade do líquido extracelular provoca redução na produção de força de contração de músculos esqueléticos, outros trabalhos demonstram que a quantidade de cálcio liberada pelo retículo sarcoplasmático é potencializada pelo incremento da tonicidade extracelular (Chawla, Skepper, Hockday and Huang, 2001, Caputo 1966). Considerando que o processo de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático é a última etapa do processo de acoplamento excitação-contração de fibras musculares esqueléticas, concluímos que as consequências fisiológicas do incremento da tonicidade do meio extracelular deve alterar esse processo não se descartando também a possibilidade de que o aumento da força iônica do meio intracelular possa influenciá-lo direta ou indiretamente bem como podendo alterar o fenômeno da interação das proteínas do sistema contrátil.

Neste trabalho reavaliamos os efeitos de soluções de alta tonicidade no fenômeno de contração de células musculares de anfíbios. Empregando, para fazer o aumento da tonicidade do líquido extracelular 4 diferentes tipos de osmólitos: NaCl, sacarose, betaina e óxido de trimetilamina (TMAO). Destes apenas o NaCl e sacarose tem sido empregados em estudos realizados por outros laboratórios. O TMAO e a betaina são osmólitos de ocorrência natural presentes no meio intra e extracelular de muitos animais marinhos e de estuários (Yancey, Clark, Hand, Bouwllus and Somero, 1982; Meis & Inesi, 1987). Vários trabalhos demonstram que estes compostos não desempenham apenas o papel fisiológico de regular a osmolaridade do líquido intra e extracelular. Estudos demonstram que estes osmólitos protegem proteínas contra os efeitos deletérios de alta força iônica (Yancey, Clark, Hand, Bouwllus and Somero, 1982; Godt, Fogaça, Andrews and Nósek, 1993), de altas concentrações de uréia (Yancey, Clark, Hand, Bouwllus and Somero, 1982; Meis & Inesi, 1987; Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993) e

temperatura (Yancey, Clark, Hand, Bouwllus and Somero, 1982;). Conforme demonstrado na figura 5B o uso de NaCl para se promover incremento da tonicidade do líquido extracelular promoveram redução da amplitude de encurtamento muscular induzido por solução contendo 100 mM de K⁺. Efeito semelhante foi obtido com o uso de betaína. A redução nos níveis de encurtamento muscular induzido por soluções hipertônicas de cloreto de sódio poderia ser decorrente de uma redução na capacidade de liberação de quantidades adequadas de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Este não é provavelmente o mecanismo visto que a liberação de íons cálcio induzida pela cafeína foi potencializada por soluções hipertônicas de NaCl. Estes dados sugerem que o mecanismo de liberação de íons cálcio induzido não é o responsável pela redução do encurtamento muscular verificado. Não se descarta contudo que os efeitos da betaína não envolva tal mecanismo, visto que não realizamos experimentos para elucidar seu (s) mecanismo (s) de ação (ões), e não existem dados na literatura a este respeito.

Os efeitos no encurtamento muscular de soluções hipertônica obtidas com o emprego de sacarose verificadas neste trabalho não estão de acordo com outros dados existentes na literatura. Vários trabalhos demonstram que a hipertonidade do líquido extracelular obtido com sacarose reduzem a produção de força muscular (Gordon & Godt, 1970; Vaughan, Dusik and Trotter, 1982; Mansson, 1989; Lamb, Stephenson & Stienen, 1992). Contudo, existe a possibilidade de que o aumento na produção de força não foi obtido pôr outros autores pelo fato dos mesmos empregarem, geralmente concentrações de sacarose superiores a 300 mM. Se analisarmos os dados obtidos neste trabalho verificamos que existe a tendência da redução de força quando se empregam concentrações de sacarose superiores a 300 mM.

A potencialização da contratura potássica (100 mM) induzida por soluções hipertônicas obtidas com o uso de TMAO é bastante evidente. O valor máximo de potencialização foi obtido com concentrações de TMAO de 100 mM. Algumas espécies animais apresentam, no líquido extracelular níveis iguais ou mesmo superiores a este. Estes dados sugerem que este composto pode desempenhar um importante papel modulador do processo de acoplamento excitação-contração, contrabalançando por exemplo os efeitos deletérios de elevada força iônica do líquido extracelular (semelhantes aquelas encontradas em alguns animais marinhos) de forma semelhante ao observado em condições de laboratório. Em outras palavras, a estratégia de elevação da tonicidade do líquido extracelular pelo emprego de osmólitos abundantes no meio aquático, como o cloreto de sódio pode levar a redução na eficiência do processo de amplificação do sinal elétrico da membrana celular à liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, o que culmina com redução na produção de força pelas células musculares. Esta situação aparentemente paradoxal seria resolvida pela presença de outra classe de osmólito que não apresentando carga elétrica resultante, não alteraria a força iônica dos meios extra e intracelular, e contrabalançaria os efeitos deletérios promovido por íons.

Analisando os dados deste trabalho no seu conjunto, verificamos que as modificações nos níveis de encurtamento muscular induzido por soluções hipertônicas não podem ser atribuídas única e exclusivamente ao efeito do aumento da pressão osmótica do líquido extracelular. Se assim o fosse haveria coincidência do parâmetro mensurado (encurtamento muscular) numa idêntica condição experimental em soluções cuja tonicidade tenha sido ajustada com diferentes osmólitos. Os dados obtidos neste trabalho demonstram portanto, que a alteração da contractilidade muscular obtido nestas condições

experimentais não pode ser atribuída a um único mecanismo. Assim é provável que o aumento na força iônica do meio intracelular não seja o único e exclusivo mecanismo envolvido, já que se espera idêntica alteração neste parâmetro, quando se empregam diferentes osmólitos para se fazer o ajuste da tonicidade do líquido extracelular. Comparativamente, verificou-se que o incremento na tonicidade do líquido extracelular obtido pela adição de NaCl promoveu redução no grau de encurtamento muscular, enquanto que com o TMAO ocorreu um aumento. Como em células musculares destituídas de membrana citoplasmática este composto aumenta a sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio e neutraliza o efeito de soluções de elevada força iônica (Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993) haveria a possibilidade de que o óxido de trimetilamina estaria atuando diretamente no sistema contrátil. Como curso temporal das modificações de massa muscular obtido em soluções de Ringer hipertônicas de sacarose ou de NaCl não diferiram, isto sugere que o coeficiente de reflexão de ambos os solutos apresentam valores idênticos e que a condutividade hidráulica da membrana citoplasmática não se modificou com a presença destes solutos. Isto por que as modificações do volume celular são normalmente ocasionados pela movimento transmembrana (J_v) de água o qual depende das diferenças de pressões osmóticas ($\Delta\pi$) e hidrostática (Δp) entre os compartimentos e da condutividade hidráulica da membrana (L_p). Por sua vez $\Delta\pi$ depende das diferenças efetivas de concentração transmembrana e do coeficiente de reflexão do soluto. Portanto é pouco provável que o óxido de trimetilamina esteja alterando o encurtamento muscular por um mecanismo de ação direta na maquinaria do sistema contrátil.

O aumento da tonicidade do líquido extracelular obtido com a adição de óxido de trimetilamina não provoca aumento na força iônica da solução visto que este composto não apresenta carga elétrica resultante. Por outro lado, o

uso de íons (como o sódio e cloreto) provocam aumento também na força iônica do meio extracelular, e isto poderia levar a perturbação protéica resultando em alterações do processo de acoplamento-excitação contração. Esta é uma hipótese que não poderá ser descartada visto que alterações funcionais muitas vezes irreversíveis são obtidas quando se empregam íons para se proceder o aumento da tonicidade do meio extracelular.

A potencialização da contratura potássica induzida pelo óxido de trimetilamina pode ser decorrente de alterações nos passos de excitação do sarcolema, do acoplamento dos receptores DHP com os receptores RYR e dos mecanismos de liberação de cálcio. Neste estudo investigamos duas destas possibilidades. O íon perclorato é um composto químico que pode ser considerado um agente desestabilizante protéico. Em músculo esquelético este composto potencializa o processo de acoplamento excitação contração deslocando para a esquerda a relação contração/despolarização da membrana (Dulhunty, Zhu, Patterson and Ahern, 1992). Estudos demonstram que este composto torna o sensor de voltagem (receptores DHP) mais sensíveis à própria variação de voltagem (Dulhunty, Zhu, Patterson and Ahern, 1992; Csernoch, Kovács and Szucs, 1987). Verificamos neste estudo que altas concentrações deste composto potencializou a contratura potássica e promoveu contrações musculares parcialmente irreversíveis (figura 7A). A irreversibilidade das contraturas na presença de perclorato poderia ser decorrente de efeitos desse ânion ao nível das proteínas contráteis. Contudo, este não é o provável mecanismo, visto que a prévia incubação das preparações com o óxido de trimetilamina aboliu o caráter irreversível destas contraturas e potencializou grandemente as contrações subsequentes promovidas por 100 mM de potássio (figura 7B). Considerando que o TMAO não ultrapassa o sarcolema nossos dados sugerem que o óxido de

trimetilamina protege as estruturas envolvidas no processo de acoplamento-excitação contração as quais seriam afetadas pelo perclorato. A potencialização das contraturas potássicas induzidas pelo óxido de trimetilamina poderia também ser atribuída a maior sensibilização dos receptores dihidropiridínicos à variação de voltagem. Contudo, este composto não potencializou a contratura induzida por 40 mM de K⁺, sugerindo que este composto não deslocou a curva encurtamento muscular/variação de voltagem para a esquerda como o fez o íon perclorato, um íon que potencializa o processo de acoplamento excitação contração por este mecanismo.

A cafeína é um composto vastamente empregado como ferramenta para o estudo do processo de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (Meissner, Lai, Anderson, Xu, Liu, Herrmann-Frank, Rousseau, Jones and Lee, 1991; Franzini-Armstrong & Protasi, 1997; Shoshan-Barmatz & Asheley, 1998; Csernoch, Szentesi and Kovács, 1999). Tem sido demonstrado que a cafeína não altera outros passos do processo de acoplamento excitação contração mais induz diretamente a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático por um mecanismo semelhante ao de liberação de cálcio induzido pelo próprio cálcio. Neste trabalho avaliamos os efeitos de soluções hipertônica, ajustadas com NaCl, sacarose ou TMAO na contratura cafeínica. Verificamos que estas soluções potencializaram o efeito da contração muscular induzida por concentrações submaximais de cafeína. Para um dado valor de concentração (200 mM), a ordem de eficiência de potencialização foi NaCl<Sacarose<TMAO. Comparando-se com a contratura induzida por 100 mM de K⁺, a contratura cafeínica atingiu aproximadamente 10 % desta (figuras 9,11 e 12). Em soluções hipertônicas obtidas com NaCl, sacarose e TMAO estes valores foram respectivamente, de 80 % , 400 % e 1200% aproximadamente. Estes dados demonstram claramente que os efeitos de

soluções hipertônicas no processo de acoplamento-excitação contração não pode ser atribuído única e exclusivamente aos efeitos da tonicidade do meio. Chawla et al (Chawla, Skepper, Hockday and Huang, 2001), demonstraram que em músculo esquelético da rã, soluções hipertônicas induziram o aparecimento de ondas intracelulares de cálcio, mensuradas com o indicador de cálcio, fluo 3. Tais oscilações mantiveram-se na ausência nominal de íons cálcio, não foram bloqueadas por bloqueadores específicos dos receptores dihidropiridínicos ou por despolarização da membrana celular. Estas oscilações de cálcio intracelular induzidas por soluções hipertônicas foram potencializadas pela cafeína e bloqueadas pela raionadina, um bloqueador específico dos receptores RYR. Estes autores atribuem os efeitos de soluções hipertônicas a uma potencialização do mecanismo de liberação de cálcio induzido pelo próprio cálcio. Caputo (Caputo, 1968) demonstrou também que a contratura cafeínica de fibras isoladas de músculo esquelético da rã foi potencializada por exposição das preparações à soluções hipertônicas. Efeitos semelhantes tem sido também demonstrado por outros autores (Lännergren and Noth, 1973; Godt, Fogaça, Andrews and Nosek, 1993). Os dados obtidos neste trabalho demonstram que as soluções hipertônicas potencializaram a contratura cafeínica indicando que o mecanismo de liberação de cálcio induzido pelo próprio cálcio pode estar envolvido, visto que soluções hipertônicas reduzem o espaço existente entre o sistema tubular transverso e a cisterna terminal do retículo sarcoplasmático, conforme demonstrado por Chawla et al (Chawla, Skepper, Hockday and Huang, 2001). As diferenças na magnitude das potencializações das contraturas cafeínicas induzidas por soluções hipertônicas sugerem a existência de múltiplos mecanismos envolvidos em tal atividade. Uma possibilidade seria a de que o TMAO poderia atuar diretamente nos RYR do retículo sarcoplasmático e assim

aumentar a sensibilidade dos mesmos à liberação do cálcio induzida por cálcio. Tal possibilidade é contudo remota, visto que o óxido de trimetilamina não alterou a massa de preparações isoladas de músculo sartório submetidas a soluções hipertônicas obtidas com este composto (figura 4) o que nos sugere que este composto não ultrapassa a membrana celular. Outra forte evidência de que o TMAO não potencializa o efeito da cafeína por afetar diretamente o RYR é de que, em fibra permeabilizada com o uso de saponina, este composto não potencializou a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático induzido pela cafeína (figura 13). Neste modelo experimental o óxido de trimetilamina também não induziu “per se” a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático. Estes resultados são particularmente importantes pois sugerem que a integridade da membrana do sistema tubular transversal e/ou retículo são importantes para o acoplamento dos receptores DHP com os RYR, já que o tratamento das preparações com saponina promove perda das propriedades seletivas da membrana celular. Outra possibilidade é de que os estado conformacional do DHP (ditado pelo potencial transmembrana) e de sua interação com os RYR, são importantes para a modulação da liberação de íons cálcio.

Estudos demonstram a ocorrência de alterações estruturais do sistema tubular transversal e de seu acoplamento com as cisternas terminais do retículo sarcoplasmático (Valdiosera, Clausen and Eisenberg, 1974; Franzini-Armstrong, Heuser, Reese, Somlyo and Somlyo, 1978) em preparações submetidas a soluções hipertônicas. Assim, estudos posteriores deverão ser realizados com o objetivo de se comparar e correlacionar as alterações morfológicas induzidas por soluções hipertônicas ajustadas com diferentes osmólitos com os dados de força de contração muscular.

5. CONCLUSÕES

Empregando a técnica de músculo sartório isolado de rã, investigamos os efeitos de soluções hipertônicas ($\cong 50$ a 300 mOsmol/kg de H_2O), ajustadas com NaCl, sacarose, betaina e óxido de trimetilamina (TMAO) no encurtamento muscular induzido por solução contendo elevada concentração de K^+ . Verificamos que soluções hipertônicas ajustadas com NaCl ou betaina reduziram de forma dependente de concentração, o grau de encurtamento muscular. As soluções contendo sacarose ou TMAO potencializaram a contratura potássica.

As contraturas induzidas por concentrações submaximais de cafeína foram potencializadas pelos diferentes osmólitos. Por ordem, o grau de potencialização obtido foi: TMAO \gg sacarose \gg NaCl.

Em fibras permeabilizadas com o uso de saponina, a sacarose ou o TMAO não induziram a liberação de íons cálcio do RS nem potencializaram os efeitos da cafeína.

O íon perclorato induziu contração muscular irreversível. A previa incubação das preparações com TMAO (50 mM) tornou-as reversíveis. Estes dados sugerem que:

- 1- Soluções hipertônicas afetam o processo de acoplamento excitação-contracção em diferentes etapas. Tais efeitos são dependentes do osmólito utilizado para se proceder o ajuste da tonicidade
- 2- Soluções hipertônicas ajustadas com o TMAO ou sacarose provavelmente alteram a transdução do sinal elétrico da membrana do sistema tubular transversal para os canais de cálcio presentes na membrana do retículo sarcoplasmático.

- 3- O TMAO impede os efeitos deléteiros do íon perclorato no processo de acoplamento-excitação contração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. et al. (1999). Fisiologia. 2ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 934 p.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. (1997). Biologia Molecular da Célula. 3ª Edição. Editora Artes Médicas Sul Ltda. São Paulo. 1294p.
- ALLEN, T. J. & CHAPMAN, R. A. (1995). The effect of a chemical phosphatase on single calcium channels and the inactivation of whole-cell calcium current from isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Pflug. Arch.* 430, 68-80.
- ACHILLES, W., CUMME, G. A. & HOPPE, H. (1973). The myofilament lattice: studies on isolated fibers II. The effects of osmotic strength, ionic concentration, and pH upon the unit-cell volume. *J. Cell Biol.* 53, 53-65.
- ALTRINGHAM, J. D., YANCEY, P. H. & JOHNSTON, I. A. (1982). The effects of osmoregulatory solutes on tension generation by dogfish skinned muscle fibres. *J. Exp. Biol.* 96, 443-445.
- ANDREWS, M. A. W., MAUGHAN, D. W., NOSEK, T. M. & GODT, R. E. (1991). Ion-specific and general ionic effects on contraction of skinned fast-twitch skeletal muscle from the rabbit. *J. Gen. Physiol.* 98, 1105-1125.
- ASHLEY, C. C. & MULLIGAN, I. P. (1991). Ca^{2+} and activation mechanisms in skeletal muscle. *Q. Rev. Biophys.* 24, 1-73.
- BERS, D. M. & FILL, M. (1998). Coordinated feet and the dance of Ryanodine receptors. *Science.* 281, 790-791.

- BLACK, B. A.; IMAGAWA, T.; CAMPBELL, K. P.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in the skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 107, 2587-2600
- BOWLUS, R. D. & SOMERO, G. N. (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure: Rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J. Exp. Zool.* 288, 137-152.
- BRENNER, B. (1986). The cross-bridge cycle in muscle. Mechanical, biochemical, and structural studies on single skinned rabbit psoas fibers to characterize cross-bridge kinetics in muscle for correlation with the actomyosin-ATPase in solution. *Bas. Res. Cardiol.* 81, 1-15.
- BRENNER, B. (1991). Muscle mechanics and biochemical kinetics. In *Molecular Mechanisms in Muscular Contraction*, ed. SQUIRE, J. M., pp. 77-149. Boca Raton: CRC Press, Inc..
- BROWN, A. D. (1976). Microbial water stress *Bact. Rev.* 40, 803-846.
- BROWN, A. D. & SIMPSON, J. R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: The role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72, 589-591.
- BURG, M. B. (1995). Molecular basis of osmotic regulation. *Am. Physiol. Society.* 37, 983-996.
- BUSSELEN, P., BOSTELLS, S. & TUNSTALL, J. (1991). Caffeine rapid cooling contractures and negative force staircase in rat papillary muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23, 1313-1322.
- CHALOVICH, J. M. (1992). Actin mediated regulation of muscle contraction. *Pharmacol. Ther.* 55, 95-148.
- CHAWLA, S., SKEPPER, J. N., HOCKADAY, A. R., HUANG, C. L.-H. (2001). Calcium waves induced by hypertonic solutions in intact frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 536.2, 351-359.

- CLARK, M. E., BURNELL, E. E., CHAPMAN, N. R. & HINKE, J. A. M. (1982). Water in barnacle muscle IV. Factors contributing to reduced self-diffusion. *Biophys. J.* 39, 289-299.
- CLARK, M. E. & ZOUNES, M. (1977). The effects of selected cell osmolytes on the activity of lactate dehydrogenase from the euryhaline polychaete, *Nereis succinea*. *Biol. Bull.* 153, 468-484.
- COGNARD, C., RIVET-BASTIDE, M. & RAYMOND, G. (1992). Progressive predominance of 'skeletal' versus 'cardiac' types of excitation-contraction coupling during in vitro skeletal myogenesis. *Pflug. Arch.* 422, 207-209.
- COOKE, R. (1997). Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol. Rev.* 77, 671-697.
- CSERNOCH, L., KOVÁCS, L. & SZUCS, G. (1987). Perchlorate and the relationship between charge movement and contractile activation in frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond)*. 390, 213-227.
- CSERNOCH, L., SZENTESI, P. & KOVÁCS, L. (1999). Differential effects of caffeine and perchlorate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond)*. 520.1, 217-230.
- CURTIS, B. A. (1992). Excitation-contraction coupling in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Na/Ca exchange and first messenger Ca in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Adv. Med. Biol.* 311, 1-17.
- DULHUNTY, A. F. (1991). Activation and inactivation of excitation-contraction coupling in rat soleus muscle. *J. Physiol. (Lond)*. 239, 605-626.
- DULHUNTY, A. F., AHU, P., PATTERSON, M. F. & AHERN, G. (1992). Actions of perchlorate ions on rat soleus muscle fibers. *J. Physiol.* 448, 99-119.

- FABIATO, A. (1981). Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J. Gen. Physiol.* 78, 457-497.
- FABIATO, A. (1992). Two kinds of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 311, 245-262.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978). Effect of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol. (Lond)*. 276, 233-255.
- FILL, M. D. & BEST, P. M. (1989). Block of contracture in skinned frog skeletal muscle fibers by calcium antagonists. *J. Gen. Physiol.* 93, 429-449.
- FINCH, E. A., TURNER, T. J. & GOLDIN, S. M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-triphosphate induced calcium release. *Science*. 252, 443-446.
- FOGAÇA, R. T. H., ANDREWS, M. A. & GODT, R. E. (1990). Trimethylamine N-oxide (TMAO) protects skinned skeletal muscle fibers from the deleterious effects of increased ionic strength. *Biophys. J.* 57, 546a(Abstract).
- FOGAÇA, R. T. H., NOSEK, T. M. & GODT, R. E. (1992). Synergistic effect of phosphate and pH on force of skinned fibers from fast-twitch but not slow-twitch or cardiac muscle from a variety of mammals. *Biophys. J.* 61, 20a (Abstract).
- FOSKETT, J. K. & WONG, D. (1991). Free cytoplasmic Ca^{2+} concentration oscillations in thapsigargin-treated parotid acinar cells are caffeine-sensitive and ryanodine-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266, 14535-14538.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. HEUSER, J. E., REESE, T. S., SOMLYO, A. P. & SOMLYO, A. V. (1978). T-tubule swelling in hypertonic solutions: a freeze substitution study. *J. Physiol.* 283, 133-140.

- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & NUNZI, G. (1983). Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J. Musc. Res. Cell. Motil.* 4, 233-252.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C & PROTASI, F. (1997). Ryanodine receptors of striated muscle: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiological Review*, USA. 3, 699-729
- GARRET, R. H & GRISHAN, C. M. (1995). Muscle contraction. Molecular aspects of Cell Biology. *Orlando: Saunders College Publishing*. 1156-1176.
- GEKKO, K. & TIMASHEFF, S. N. (1981). Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* 20, 4677-4686.
- GERARD, J. F. & GILLES, R. (1976). Non-isovolumic behavior of the unit cell of skinned striated muscle fibers. *J. Mol. Biol.* 101, 107-114.
- GODT, R. E., FOGAÇA, R. T. H. & NOSEK, T. M. (1991). Changes in force and calcium sensitivity in the developing avian heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 1692-1697.
- GODT, R. E., FOGAÇA, R. T. H., ANDREWS, M. A. W. & NOSEK, T. M. (1993). Influence of ionic strength on contractile force and energy consumption of skinned fibers from mammalian and crustacean striated muscle. In *Mechanism of myofilament sliding in muscle contraction*, eds. SUGI, H. & POLLACK, G. H., pp.763-773 New York and London: Plenum Press.
- GODT, R. E. & LINDLEY, B. D. (1982). Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog. *J. Gen. Physiol.* 80, 279-297.
- GODT, R. E. & MAUGHAN, D. W. (1977). Swelling of skinned muscle fibers of the frog. Experimental observations. *Biophys. J.* 19, 103-116.

- GODT, R. E. & MAUGHAN, D. W. (1981). Influence of osmotic compression on calcium activation and tension in skinned muscle fibers of the rabbit. *Pflüg. Arch.* 391, 334-337.
- GODT, R. E. & MAUGHAN, D. W. (1988). On the composition of the cytosol of relaxed skeletal muscle of the frog. *Am. J. Physiol.* 254, C591-C604.
- GOLDAMER E. V. & HERTZ, H. G. (1970). Effects of hypertonicity on resting and contracting frog skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 226, 855-863.
- GOLDMAN, Y. E. & BRENNER, B. (1987). Special topic: Molecular mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Physiol.* 49, 629-636.
- GORDON, A. M., HOMSHER, E. & REGNER, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* 80, 853-924.
- GREANEY, G. S. & SOMERO, G. N. (1980). Water-solute adaptations: The evolution and regulation of biological solutions. In *Biochemical Adaptation*, eds. HOCHACHKA, P. W. & SOMERO, G. N, pp. 305-354. Princeton: Princeton University Press.
- GUTH, K. & POTTER, J. D. (1987). Effect of rigor and cycling cross-bridges on the structure of troponin C and on the Ca^{2+} affinity of the Ca^{2+} specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers. *J. Biol. Chem.* 262, 13627-13635.
- GYÖRKE, S. & PALADE, P. (1992). Effects of perchlorate on excitation-contraction coupling in frog and crayfish skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond)*. 456, 443-451.
- HAND, S. C. & SOMERO, G. N. (1982). The composition of animal cells: Solutes contributing to osmotic pressure and charge balance. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* 76, 663-671.

- HAROOTUNIAN, A. T., KAO, J. P. Y., PARANJAPE, S., ADAMS, S. R., POTTER, B. V. L. & TSIEN, R. Y. (1991). Cytosolic Ca^{2+} oscillations in REF52 fibroblasts – Ca^{2+} stimulated IP_3 production or voltage-dependent Ca^{2+} channel as key positive feedback elements. *Cell. Calcium*. 12, 153-164.
- HOFMEISTER, F. (1888) *Arch. Esp. Pathol. Pharmacol.* 24, 247
- HUXLEY, A. F. (1957). Muscle structure and theories of contraction. *Prog* HUXLEY, H. E. & HANSON, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*. 173, 973-976.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. (1999). *Histologia Básica*. 9^a Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 427 p.
- KANNAN, M. S., FENTON, A. M., PRAKASH, Y. S. & SIECK, G. C. (1996). Cyclic ADP-ribose stimulates sarcoplasmic reticulum calcium release in porcine coronary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 270, H801-H806.
- KITA, H., NARITA, K & VAN DER KLOOT, W. (1982). The relation between tonicity and impulse-evoked transmitter release in the frog. *J. Physiol.* 325, 213-222.
- LANG, F., BUSCH, G. L., RITTER, M., VÖLKL, H., WALDEGGER, S., GULBINS, E. & HÄUSSINGER, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78, 247-306.
- LANYI, J. K. (1974). Salt-dependent properties of protein from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38, (3) 272-290.
- LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO-DE-SOUZA, A. N., SOUZA, I. T. & FIGUEIREDO, I. M. B. (1994). Effects of eugenol on excitation-contraction-coupling in skeletal muscle. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.* 327, 113-124.

- LEAVIS, P. C. & GERGELY, J. (1984). Thin filament protein and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16, 235-305
- LEE, K., ROWE, I. C. & ASCHFORD, M. L. (1995). Characterization of an ATP-modulated large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel present in rat cortical neurosomes. *J. Physiol. (Lond)*. 488, 319-337.
- MEIS, L & INESI, G. (1987). Effects of organic solvents, methylamines, and urea on the affinity for P_i of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263, 157-161.
- MEISSNER, G. (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 485-508.
- MEISSNER, G., LAI, F. A., ANDERSON, K., XU, L., LIU, Q. Y., HERRMANN-FRANK, A., ROUSSEAU, E., JONES, R. V. & LEE, H. B. (1991). Purification and reconstitution of the ryanodine- and caffeine-sensitive Ca^{2+} release channel complex from muscle sarcoplasmic reticulum. *Adv. Exp. Med. Biol.* 304, 241-256.
- MENEZES, A. A., SILVA, A. B., XIMENES, M. F & SOUSA, M. B. (1988). Variations of the ST segment in the rat electrocardiogram. *Braz. J. Med Biol. Res.* 21, 137-140.
- MILLEVOI, S; TROBITAS, K; KOLMERER, B; SCHAPER, J.; PELIN, K.; GRANZIER, H.; LABEIT, S. (1998). Characterization of nebulin and nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate z-discs. *J. Mol. Biol.* 282:1, 111-123.
- MISSIAEN, L., DE SMEDT, H., DROOGMANS, G. & CASTEELS, R. (1992). Ca^{2+} release induced by inositol 1,4,5-triphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca^{2+} in permeabilized cells. *Nature.* 357, 599-602.
- MOSS, R. L. & HOFMANN, P. A. (1992). Cellular and molecular basis of muscle contraction. *Fundamental of Medical Cell Biology.* 5b, 185-237.

- NAGY, B. & JENCKS W. P. (1965) The differential action of hypertonic solutions on the twitch and action potential of muscle fiber. *J. Physiol. (Lond)*. 136, 17p
- NOSEK, T. M., LEAL-CARDOSO, J. H., MACLAUGHLIN, M. & GODT, R. E. (1990). Inhibitory influence of phosphate and arsenate on contraction of skinned skeletal and cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 259, C933-C939.
- OBA, T., KOSHITA, M., AOKI, T. & YAMAGUCHI, M. (1997). BAY K 8644 and ClO_4^- potentiate caffeine contracture without Ca^{2+} release channel activation. *Am. J. Physiol.* 272, C41-C47.
- OOSAWA, F. *Plyelectrolytes* (Dekker, New York, 1971)
- OZEKI, M. (1975). The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 50, 183-191.
- PANG, P. K. T., GRIFFITH, R. W. & ATZ, J. W. (1977). Osmoregulation in elasmobranchs. *Am. Zool.* 17, 365-377.
- PERES, A., RACCA, C., BERTOLLINI, L. & STURANI, E. (1991). Cytosolic calcium responses induced by photolytic release of 1,4,5-inositol trisphosphate in single human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1092, 89-93.
- POLLARD, A. & WYNJONES, R. G. (1979). Patterns of water and solute regulation in the muscle regulation in the muscle fibres of osmoconforming marine decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 72, 107-126.
- POTTER, J. D.; SHANG, Z.; PAN, B. S.; ZHAO, J. (1995). A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca^{++} regulation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 270:6, 2557-2562.
- RAMOS, C. H. (1999). Mapping subdomains in the C-terminal region of Troponin I involved in its binding to troponin C and to thin filament. *J. Biol. Chem.* 274:26, 18189-18195.

- RIORDAN, J. F.; MCELVANY, K. D. & BORDERS, C. L. (1977). Studies on the enzyme enolase I. Equilibrium studies. *J. Biol. Chem.* 227, 301-328.
- RIOS, E.; MA, J. & GONZALEZ, A. (1991). The mechanical hypothesis of excitation contraction (EC) coupling in skeletal muscle. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 12, 127-135.
- RIOS, E. & BRUM, G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* 325, 717-720.
- RIOS, E. & PIZARRO, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Review.* 61, 849-908.
- ROJAS, E., NASSAR-GENTINA, V., POLLARD, M. E. & LUXORO, M. (1992). Mechanisms of calcium release from terminal cisternae in crustacean muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 311, 305-317.
- ROUSSEAU, E. & MEISSNER, G. (1989). Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel: activation by caffeine. *Am. J. Physiol.* 256, H328-H333.
- SALEH, C. E.; WARBER, K. D. & POTTER, J. D. (1986). The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 7, 387-404.
- SCHLACK, W., UEBING, A., SCHEFER, M., BIER, F., SCHEFER, S., PIPER, H. M. & THEMER, V. (1994). Regional contractile blockade at the onset of reperfusion reduces infarct size in the dog heart. *Pflug. Arch.* 428, 134-141.
- SHAW, J. (1976). Effect of changing the composition of the bathing solution upon the isometric tension-pCa relationship in bundles of crustacean myofibrils. *J. Physiol. (Lond).* 270, 627-652.
- SHENG, Z., FRANÇOIS, J. M., HOTCHCOCK DE GREGORI, S. E. & POTTER, J. D. (1991). Effects of mutations in the central helix of troponin-C on its biological activity. *J. Biol. Chem.* 266, 5711-5715.

- SHIH, C. L.; CHEN, M. J.; LINSE, K. & WANG, K. (1997). Molecular contacts between nebulin and actin: cross-linking of nebulin modulates to the N-terminus of actin. *Biochemistry*. 36, 1814-1825.
- SHOSHAN-BARMATZ, V. & ASHELEY, R. H. (1998). The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels. *Intern. Rev. Citol.* 183, 185-270.
- SIPIDO, K. R. & WIER, W. G. (1991). Flux of Ca^{2+} across the sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells during excitation contraction coupling. *J. Physiol. (Lond)*. 435, 605-630.
- STRANG, P. F. & POTTER, J. D. (1992). A monoclonal antibody that recognize different conformational states of skeletal muscle troponin C and other calcium binding proteins. *J. Musc. Cell. Motil.* 13, 308-314.
- STROMER, M. H. (1992). Immunocytochemical localization of proteins in striated muscle. *International Review of Cytology*. 42, 61-144.
- SU, J. Y. & CHANG, Y. I. (1993). Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels by caffeine, Ca^{2+} , and Mg^{2+} in skinned myocardial fibers of fetal and adult rats. *Pflug. Arch.* 423, 300-306.
- TAVERNIER, B. M., ADNET, P. J., IMBENOTTE, M., ETCHRIVI, T. S., REYFORD, H., HAUDECOEUR, G., SCHERPEREEL, P. & KRIVOSIC-HORBER, R. M. (1994). Halothane and isoflurane decrease calcium sensitivity and maximal force in human skinned cardiac fibers. *Anesthesiology*. 80, 625-633.
- VALDIOSERA, R., CLAUSEN, C. & EISENBERG, R. S. (1974). Impedance of frog skeletal muscle fibers in various solutions. *J. Gen. Physiol.* 63, 460-491.
- VALDIVIA, C., VAUGHAN, D., POTTER, B. V. L. & CORONADO, R. (1992). Fast release of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle: Evidence for two types of Ca^{2+} release channels. *Biophys. J.* 61, 1184-1193.

- VERGARA, J., TSIEN, R. Y. & DELAY, M. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate: A possible chemical link in excitation-concentration coupling in muscle. *Proc. Natl. Acad. USA*. 82, 6352-6356.
- VON HIPPEL, P. H. & SCHLEICH, T. (1969) In *Structure and Stability of Biological Macromolecules*. N. Timasheff and G. D. Fasman. Eds Dekker, New York p. 417.
- WATANABE, A., TOMOIKE, H. & ENDOH, M. (1996). Ca^{2+} sensitizer Org-30029 reverses acidosis- and BDM-induced contractile depression in canine myocardium. *Am. J. Physiol.* 271, H1829-H1839.
- WIER, W. G. & BLATTER, L. A. (1991). Ca^{2+} oscillations and Ca^{2+} waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell. Calcium*. 12, 241-254.
- WIER, W. G. & YUE, D. T. (1986). Intracellular calcium transients underlying the short-term force-interval relationship in ferret ventricular myocardium. *J. Physiol. (Lond)*. 376, 507-530.
- XU, Y. J., PANAGIA, V., SHAO, Q., WANG, X & DHALLA, N. S. (1996). Phosphatidic acid increases intracellular free Ca^{2+} and cardiac contractile force. *Am. J. Physiol.* 271, H651-H659.
- YANCEY, P. H., CLARK, P. H., HAND, S. C., BOWLUS, R. D. & SOMERO, G. N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1222.
- YANCEY, P. H. & SOMERO, G. N. (1979). Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of Elasmobranch fishes. *Biochem. J.*
- YE, J. H. & MCARRDLE, J. J. (1996). 2,3-Butanedione monoxime modifies the glycine-gated chloride current of acutely isolated murine hypothalamic neurons. *Brain Res.* 735, 20-29.
- ZEIDLER, M. D. In *Water: A comprehensive Treatise* vol 2. Water in crystalline hydrates: Aqueous Solutions of simple nonelectrolytes, F. Franks, Ed.(Plenum, New York, 1973) p. 529.

- ZHANG, L., BRADLEY, M. E., KHOYI, M., WESTFALL, D. P. & BUXTON, I. L. O. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding sites in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 109, 905-912.
- ZHU, Y. & NOSEK, T. M. (1992). Ruthenium red affects the contractile apparatus but not sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release of skinned papillary muscle. *Pflug. Arch.* 420, 255-258.
- ZOU, H., RATZ, P. H. & HILL, M. A. (1995). Role of Myosin phosphorylation and (Ca^{2+}) in myogenic reactivity and arteriolar tone. *Am. J. Physiol.* 269, H1590-H1596.
- ZOT, A. S. & POTTER, J. D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Ver. Biophys. Chem.* V.16, 535-559.